

Untersuchungen zur Charakterisierung des Nikotineinflusses auf den ziliären Partikeltransport im respiratorischen Epithel der Maus

Ivelina Boseva

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Untersuchungen zur Charakterisierung des
Nikotineinflusses auf den ziliären Partikeltransport im
respiratorischen Epithel der Maus

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Ivelina Boseva

Zahnärztin aus Troyan, Bulgarien

Gießen 2013

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. A. Günther

Tag der Disputation: 12.11.2014

Meiner Mutter

1	EINLEITUNG	1
1.1	Trachea	1
1.1.1	Ultrastruktur der Mastrachea	1
1.1.2	Zilienmorphologie	2
1.1.3	Das Trachealsekret	4
1.1.4	Zilienschlag	5
1.2	Das cholinerge System	6
1.3	Zelluläre Funktionen des ACh im respiratorischen Epithel und anderen nicht neuronalen Zellen	8
1.4	Nikotinische Azetylcholinrezeptoren (nAChR)	9
1.5	Struktur der neuronalen nAChR	12
1.6	Funktionsweise der nAChR	13
1.7	Beeinflussbarkeit der nAChR durch Pharmaka	14
1.8	Ziel der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Pharmaka	17
2.1.3	Puffer und Lösungen	18
2.1.4	Geräte und Laborbedarf	19
2.1.5	Versuchstiere	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Organentnahme	20
2.2.2	Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit	21
2.2.2.1	Vorbereitung des Mikroskops	22
2.2.2.2	Messungen der PTG der Trachea	22
2.2.2.3	Versuche an C57Bl/6 Mäusen	22
2.2.2.4	Versuche	23
2.2.2.5	Versuche mit Nikotin in einer Endkonzentration von 10^{-4} M bei nAChR α 7-/-Mäusen und entsprechendem WT-Stamm	23

2.2.2.6	Versuche mit den Antagonisten α -Conotoxin MII (10^{-4} M) bzw. Mecamylamin (10^{-4} M) und die entsprechenden Kontrollen bei C57Bl/6 Mäus	24
2.2.3	Auswertung	25
2.2.4	Statistik	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Konzentrationsabhängigkeit und Desensitisierung der Nikotinwirkung bei C57/Bl6 Mäusen	29
3.2	Messung der PTG in der Trachea nach Zugabe von Nikotin (10^{-4} M) und ATP (10^{-4} M)	33
3.2.1	PTG nach Zugabe von Nikotin bei C57Bl/6 Mäusen	33
3.2.2	PTG nach Zugabe von Nikotin bei nAChR $_{\alpha 7}^{-/-}$ Mäusen	35
3.2.3	Vergleich der PTG nach Nikotin- und ATP-Zugabe bei nAChR $_{\alpha 7}^{-/-}$ und C57Bl/6 WT Mäusen	37
3.3	Auswirkung der Gabe von Nikotinrezeptorantagonisten auf die PTG bei C57Bl/6 Mäusen.	39
3.3.1	Mecamylamin	39
3.3.2	α -Conotoxin MII	40
4	DISKUSSION	
4.1	Messung des ziliären Partikeltransports mittels einer etablierten Methode	42
4.2	Nikotin vermittelt über nAChR eine stimulierende Wirkung auf PTG	43
4.3	Eingrenzung der an der PTG–Steigerung beteiligten nAChR	45
4.4	α-Conotoxin MII hat keinen Einfluss auf die durch Nikotin erhöhte PTG	47
4.5	Schlussfolgerung	48
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	SUMMARY	50

Inhaltsverzeichnis

7	LITERATURVERZEICHNIS	56
8	ERKLÄRUNG	68
9	DANKSAGUNG	69
10	LEBENS LAUF	

1 Einleitung

1.1 Trachea

1.1.1 Ultrastruktur der Mastrachea

Das Trachealepithel der Maus besteht aus mehrreihigem, hochprismatischem Flimmerepithel. Dieses Epithel verhindert nicht nur die Penetration von fremden Noxen, indem es eine mechanische Barriere bildet, sondern trägt auch zusammen mit den umliegenden Drüsen zu der wichtigen Mukusbildung bei, bindet die eingeatmeten Partikel und beseitigt diese in Richtung Pharynx (Richardson et al., 1973, 1976).

Neben den zilientragenden Flimmerepithelzellen treten bei der Mastrachea noch sekretorische Zellen, Basalzellen, Bürstenzellen, vereinzelt Becherzellen und neuroendokrine Zellen auf, die alle gemeinsam als nicht-zilientragende Zellen bezeichnet werden.

Die Flimmerepithelzellen stellen 32 bis 55% der Gesamtzahl der Trachealepithelzellen in den verschiedenen Säugetieren dar. Sie sind säulenförmig angeordnet und sitzen breit der Basalmembran auf (Pavelka et al., 1976). Mit einer Länge von ca. 6 µm erreichen sie das Lumen der Trachea und besitzen auf ihrer apikalen Oberfläche zahlreiche Zilien. Ihr Zytoplasma ist weniger elektronendicht als das aller anderen Epithelzellen (Pack et al., 1980).

Die am häufigsten vorkommenden nicht-zilientragenden Zellen in der Mastrachea sind die sekretorischen Zellen. Sie treten oft in Gruppen auf. Die apikale Membran der sekretorischen Zellen ist mit vielen kurzen Mikrovilli versehen und wölbt sich gegen das Lumen vor (Pack et al., 1980). Die Zellen besitzen in ihrem apikalen Zellteil zahlreiche, elektronendichten sekretorische Vesikel (Pack et al., 1980). Aus diesem Grund vermuten Hansell und Moretti, dass sie für die Mukusbildung verantwortlich sind und schreiben ihnen morphologische Ähnlichkeit mit den Clara-Zellen der distalen Atemwege zu (Hansell und Moretti 1969; Pack et al. 1980).

Die Basalzellen haben ovale bis dreieckige Form und liegen direkt der Basalmembran auf, ohne das Lumen der Trachea zu erreichen (Hansell und Moretti, 1969). Sie stellen 5-10% aller Epithelzellen in der Maus dar und haben ähnliche Ultrastruktur wie bei anderen Spezies (Pack et al., 1980). Ihr Zytoplasma ist mit zahlreichen Bündeln von

Tonofibrillen verschiedener Dicke und Verlaufsrichtung durchzogen (Pavelka et al., 1976). Laut Erjefält und Mitarbeitern können die Basalzellen sich bei einer Verletzung oder Verlust des Flimmerepithels innerhalb kürzester Zeit abflachen und verbreitern und besitzen somit eine Barrierefunktion (Erjefält et al., 1997).

Die Bürstenzellen gehören zu den nicht-zilientragenden Zellen, die selten in der Trachea der Maus vorkommen. In ihren apikalen Teil haben sie einen dicht gepackten Saum aus Mikrovilli. In den Zellen befinden sich luminal gelegen typische membran-begrenzte Vesikel, die auf eine absorptive Funktion hindeuten (Jeffery und Reid, 1975). Jüngst wurden sie aber als chemosensorische Zellen identifiziert, die Bitterstoffe, darunter bakterielle Produkte, wahrnehmen können und daraufhin reflektorisch eine Verringerung der Atemfrequenz bewirken (Krasteva et al., 2011).

Die Becherzellen kommen vereinzelt zwischen den Flimmerzellen vor (Pavelka et al., 1976). Ihr apikaler Zellteil ragt weit über die benachbarten Epithelzellen hinaus (Hansell und Moretti, 1969) und ist sowohl mit serösen als auch mit mukösen Vesikeln angefüllt, die mikroskopisch unterschiedlich erscheinen und laut Pack und Mitarbeitern eine sekretorische Funktion haben (Pack et al., 1980).

Die endokrinen Zellen kommen selten vor und sind vereinzelt verteilt oder dicht zusammengepackt als neuroepitheliale Körperchen bevorzugt an Bronchiolenverzweigungen. Die endokrinen Zellen besitzen basal gelegene, dicht gepackte Granula, die mit bioaktiven Aminen und Neuropeptiden gefüllt sind (Linnoila, 2006).

1.1.2 Zilienmorphologie

Die Zilien sind spezialisierte Zytoplasmafortsätze, die sich von der Zelloberfläche hinausstrecken (D'Angelo und Franco., 2009). Die Zilienlänge ist genetisch bedingt und kann zwischen 2 und 50 µm variieren (Yang et al., 2007). So unterschiedlich sie in ihrer Länge sind, so zahlreiche Funktionen haben sie: Sie ermöglichen den Transport im Eileiter, den Mukustransport im Respirationstrakt, sowie die Bewegung der zerebrospinalen Flüssigkeit im Hirn (Yang et al., 2007).

Im respiratorischen Epithel der Säugetiere beträgt die Zilienlänge etwa 5-10 µm, speziell beim Menschen ca. 6-7 µm (Satir et al., 1990, Salathe et al., 2007). Im Epithel der Atemwege haben die Zilien eine wichtige Funktion bei der Beseitigung von Mukus und Fremdkörpern (Salathe et al., 2007).

Abhängig von der aktiven Beweglichkeit unterscheidet man motile Zilien (9+2 Muster)

und nicht-motile oder primäre Zilien (9+0 Muster). Der Hauptbestandteil der motilen Zilien sind komplex angeordnete 9+2 Mikrotubulus-Dubletten und Proteine, die zusammen ein Axonema bilden. Die 9 peripher angeordneten Dubletten bilden einen Ring und umgeben 2 einzelne, zentral liegende Mikrotubuli. Die Doubletten bestehen aus einem vollständigen A-Tubulus (zusammengesetzt aus 13 Protofilamenten) und aus einem unvollständigen B-Tubulus (zusammengesetzt aus 10-11 Protofilamenten) (Wanner et al., 1996).

Die Protofilamente bestehen hauptsächlich aus α - und β -Tubulin. Die Struktur der Mikrotubuli wird zusätzlich durch Tektin, ein Protein, stabilisiert. Tektin kommt an einigen Stellen vor, wo sich die beiden Tubuli vereinigen (Wanner et al., 1996). Die beiden zentralen Tubuli sind durch einen Proteinkomplex (innere Scheide) umhüllt. Von dieser inneren Scheide strahlen von den zentralen zu den peripheren Tubuli Radiärspeichen (Satir und Sleight, 1990). Diese vermitteln Signale von den zentralen Tubuli zu den Dynein-Armen und kontrollieren somit deren Aktivität (D'Angelo und Franco, 2009). Zusätzlich gibt es Nexin-Verbindungen zwischen den 9 Mikrotubulus-Dubletten, die für Ihre Stabilität sorgen und das Gleiten von den einzelnen Tubuli begrenzen (Maimoona et al., 2007). Die Bewegung des Axonemas erfolgt durch Dynein-Arme. Dabei existieren 2 Formen-innere Dynein-Arme und äußere Dynein-Arme (Satir und Christensen, 2008). Diese stellen einen Multiproteinkomplex dar, dessen Hauptkomponent ein ATPase Isoenzym ist, genannt Dynein (Satir, 1980). Die Dynein-Arme nehmen mit dem A-Tubulus der einen Dublette und mit dem B-Tubulus der benachbarten Dublette Kontakt auf. Durch ATP-Dephosphorylierung und anschließende Konformationsänderung der Dynein-Arme gleiten die Mikrotubuli aneinander (Wanner et al., 1996).

Alle 9 A-Mikrotubuli laufen an der Zilienspitze konisch zusammen, um sich dort mit einer Platte zu vereinigen und an der Zytoplasmaoberfläche einen trans-membranären Komplex zu bilden, die „ziliäre Krone“ (Satir und Sleight, 1990). Die ziliäre Krone trägt 3 bis 7 klauenartigen Fortsätze. Wanner und Mitarbeiter vermuten, dass diese Fortsätze während des effektiven Zilienschlags einen chemischen und mechanischen Kontakt mit der darüber liegenden Mukusschicht aufnehmen (Wanner et al., 1996). An der Zilienbasis enden die Tubulusdubletten im Basalkörper, der mit dem Zytoskelett verbunden ist und aus 9 Mikrotubulustripletten besteht (Guirao und Joanny, 2007). Die Mikrotubulus-Tripletten bestehen aus einem vollständigen A-Tubulus und einem

unvollständigen B- und C-Tubulus (Eley et al., 2005). Der Übergang zwischen der Basalplatte (Bereich, wo das zentral liegende Tubuluspaar endet) und der Verbindungsstelle der ziliären Membran und der Plasmamembran bildet eine Differenzierung der ziliären Membran, die „ziliäre Halskette“ (Gilula und Satir, 1972). Typisch für diese Zone sind die dichte Verpackung der 9 Mikrotubulus-Dubletten, das Fehlen des zentralen Paares und eine Reihe von „Champagnerglas“-ähnlichen Verbindungen, die sich von der Wand jeder Dublette zu der ziliären Membran erstrecken (Gilula und Satir, 1972).

1.1.3 Das Trachealsekret

Das Trachealsekret spielt eine sehr wichtige Rolle als Schutzmechanismus bei der mukoziliären Clearance (mukoziliärer Transport). Dabei erfüllt es drei Hauptfunktionen. Es wirkt als mechanische Barriere, indem es für das Anheften der Mikroorganismen und deren Entfernung aus dem Tracheobronchialbaum verantwortlich ist. Das Trachealsekret wirkt als chemische Barriere durch seine antioxidative Wirkung und sorgt als biologisches Hindernis für die Interaktion zwischen Mikroorganismen und Entzündungszellen (Wanner et al., 1996).

Wanner und Mitarbeiter schlagen ein 2-Schichten-Prinzip des Trachealsekrets vor: eine Mukusschicht und eine periziliäre Schicht. Nahe an der Zelloberfläche befindet sich die periziliäre Schicht oder Sol-Phase, die ungefähr die Länge der ausgestreckten Zilien hat (5-7 μm). Sie ist eine wässrige Schmierflüssigkeit mit geringerer Viskosität (Smith et al., 2008) und ermöglicht dadurch den schnellen Zilienschlag und isoliert gleichzeitig die Epitheloberfläche von der Mukusschicht. Über der Sol-Phase liegt eine Mukusschicht oder Gel-Phase. Das ist eine hoch visköse, nicht newtonsche Flüssigkeit. Sie besteht aus 98% Wasser, 1% Salze und 1% glykosylierten Muzinproteinen (Smith et al., 2008). Diese Schicht kann inhalierte Partikel binden und sie beseitigen (Knowles und Richard, 2002).

Um einen effektiven Mukustransport zu ermöglichen, muss nach Satir und Sleight (1990) die perizelluläre Schicht die entsprechende Tiefe haben. Wenn die periziliäre Schicht zu tief ist, können die Zilienspitzen den Mukus nicht erreichen und damit keinen effektiven Transport gewährleisten. Wenn die periziliäre Schicht zu niedrig ist, können die Zilien nicht ihre effektive Bewegung durchführen und es kommt zum Stillstand des Mukustransports (Satir und Sleight, 1990).

Über die Wichtigkeit der Mukusschicht und den Zusammenhang zwischen Mukus und Partikeltransport schreiben auch Sleigh und Mitarbeiter in 1988. Sie konnten zeigen, dass durch die Entfernung der Mukusschicht und Austausch gegen Ringerlösung eine Reduktion des Partikeltransports ohne eine Änderung der Zilienaktivität stattfindet (Sleigh et al., 1988)

1.1.4 Zilienschlag

Die Zilien des respiratorischen Epithels sind für den Mukustransport verantwortlich. Die Zilien schlagen in metachronischen Wellen, die sich durch die hydrodynamische Kopplung benachbarter Zilien auf den Zelloberflächen fortpflanzen (Sanderson und Sleigh, 1981; Guirao und Joanny, 2007). Dabei schlagen die Zilien hoch koordiniert in eine bestimmten Richtung: kehlkopfwärts. Nur so können sie eine effiziente Propulsion des umgebenden Fluids ermöglichen (Guirao und Joanny, 2007).

Jeder Schlagzyklus besteht aus einer 2-phasigen Rückwärts-Vorwärtsbewegung mit gebrochener Symmetrie (Guirao und Joanny, 2007; Salathe et al., 2007). Jeder Schlag setzt sich aus einem „effektiven“ Schlag, die Antriebskraft für die Mukusschicht, und aus einem Rückholschlag, der gegen die Flussrichtung gerichtet ist, zusammen (Guirao und Joanny, 2007). Zwischen den beiden Phasen erfolgt immer eine Ruhephase. Dabei zeigen die Zilienspitzen in Richtung des Mukustransports (Sanderson und Sleigh, 1981). Um eine effektive Mukuspropulsion zu gewährleisten, muss das ruhende Zilium zunächst eine Rückholbewegung durchführen (Sanderson und Sleigh, 1981). Diese erfolgt, indem das Zilium bogenförmig in 180° rückwärts zur Zelloberfläche schwingt und sich dann fast vollständig streckt (Salathe, 2007). Anschließend beginnt der effektive Schlag in einer Ebene senkrecht zu der Zelloberfläche. Das Zilium bewegt sich dabei in einem Bogen von 110° und erreicht in der Spitze die maximale Geschwindigkeit von 1 mm/s (Salathe, 2007). Der effektive Schlag erfolgt 2- bis 3-mal schneller als der Rückholschlag (Sanderson und Dirksen, 1985). Nach Abschluss des effektiven Schlages ruht das Zilium kurz, um sich dann erneut in die Rückwärtsbewegung zu begeben (Salathe et al., 2007).

Bei einer Erhöhung der Zilienschlagfrequenz (ZSF) werden alle drei Phasen des Schlagzyklus verkürzt, besonders stark die Rückholbewegung und die Ruhephase (Wanner et al., 1996). Der genaue Mechanismus der Zilienbewegung während des Rückholschlages und der effektiven Bewegung ist noch nicht eindeutig geklärt. Satir

und Matsuoka (1989) schlagen die so genannte „Switch-Point“-Theorie vor, laut welcher nur die Dynein-Arme auf der einen Axonemenseite während der effektiven Bewegung aktiv sind (Satir und Matsouka, 1989). Die Dynein-Arme der anderen Axonemenseite sind dann aktiv nur während des Rückholschlages (Wanner et al., 1996).

1.2 Das cholinerge System

Azetylcholin ist phylogenetisch ein sehr altes Signalmolekül, das früh im Evolutionsprozess auftrat (vor etwa 3 Milliarden Jahren) und ubiquitär in biologischen Systemen vorkommt (Wessler et al., 2001a).

Bereits im Jahre 1914 konnten Dale und Erwins ACh in Pflanzen nachweisen (Erwins, 1914; Dale, 1914). 1926 entdeckten Loewi und Navratil eine Substanz „Parasympathin“, die aus den Nervenendigungen des Vagusnervs freigesetzt wurde. Diese wurde Acetylcholin genannt (Loewi und Navratil, 1926). Seitdem wird ACh als ein klassischer Neurotransmitter (Wessler et al, 2001), der die schnelle Kommunikation zwischen Neuronen und den Effektorzellen gewährleistet, betrachtet (Wessler et al., 2003). Im Jahre 1963 stellte Whittaker fest: „Da ACh auch in nicht-neuronalen Gewebe auftritt und weit in die Natur verbreitet ist, sollte man ihm eine nicht-neuronale Funktion zuschreiben...“.

Es existieren Beweise, dass ACh bereits in den primitiven Wirbellosen wie Schwämmen, Korallen, Pflanzen, Protozoen, Hefen, Pilzen, Blau-grüne Algen und einigen Bakterien (wie *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*) existiert (Wessler et al., 1999). ACh ist auch in vielen nicht-neuronalen Zellen nachweisbar. Morris beschreibt zum ersten Mal im Jahr 1966 das Vorkommen von nicht-neuronalem ACh in der humanen Plazenta (Morris, 1966). Nicht-neuronales ACh sowie Komponenten der cholinergen Signalwege wurden in Zellen wie Keratinozyten (Zia et al., 2000), Lymphozyten, Leukozyten (Fujii et al., 1996), Trophoblasten der Plazenta, Endothelzellen, Epithelzellen des Ösophagus und der Gingiva (Nguyen et al., 2000) nachgewiesen.

Bereits 1943 konnten Nachmansohn und Machado nachweisen, dass ACh im Axoplasma aus Azetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Cholin mit Hilfe von Cholinazetyltransferase (ChAT) synthetisiert wird (Nachmansohn et al., 1943). Neben ChAT exprimieren einige nicht-neuronalen Zellen, wie z.B Herz- und Skelettmuskel-

zellen, Carnitinacetyltransferase (CarAT), ein Enzym, das ebenso, wenn auch nicht so effizient, die Synthese von ACh bewerkstelligen kann (Tuček, 1982; Wessler et al., 1999). Acetyl-CoA ist ein Abbauprodukt der Fettsäureoxidation in den Mitochondrien, das in das Zytosol abgegeben wird. Der zweite wichtige Baustein, Cholin, kann die Zellmembran nicht durchqueren. Dafür benötigt es ein Trägertransportsystem, das den Transport in die Zelle ermöglicht. Dies erfolgt in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen mit Hilfe des hoch-affinen Cholintransporters-1 (CHT1) (Pfeil et al., 2003, Fuji et al., 2003). Diese Aufnahme ist in Neuronen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der ACh-Synthese. Der CHT1 ist stark abhängig vom Natriumgradienten und zeigt eine spezifische Hemmbarkeit durch Hemicholinium-3 (Okuda et al., 2000).

Im Anschluss an seine Synthese wird ACh in neuronalen Zellen über den vesikulären Azetylcholintransporter (VAChT), ein H^+ /ACh-Austauscher (Parsons et al., 2000), in Vesikel verpackt und über Exozytose in den postsynaptischen Spalt abgegeben (Reigada et al., 2003; González-Sistal et al., 2007). Nach Falk-Vairant und Mitarbeitern ist ein spezifisches Protein „Mediatophor“ beim letzten Schritt der ACh-Freisetzung beteiligt (Falk-Vairant et al., 1996).

Hingegen gibt es bei den nicht-neuronalen Zellen keine Beweise für die vesikuläre Speicherung von ACh und die exozytotische Abgabe (Wessler et al. 2001b; Lips et al., 2005). Wessler und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Freisetzung von ACh aus dem Trophoblasten der humanen Plazenta via organischer Kationentransporter (OCT) erfolgt (Wessler et al., 2001c). Es sind drei Isoformen der OCTs bekannt: OCT1-3. Für die ACh-Freisetzung in der Plazenta sind OCT1 und OCT3 verantwortlich, und im Tracheal- und Bronchialepithel OCT1 und OCT2 (Wessler et al. 2001b; Lips et al., 2005). Eine reversible Hemmung und damit auch eine Begrenzung der Freisetzung von ACh wird durch Quinin erreicht (Wessler et al., 2001c).

Seine Wirkung vermittelt ACh über muskarinische (mAChR) und nikotinische (nAChR) Rezeptoren, die sich an der Oberfläche von Neuronen, innervierten Effektorzellen, und an vielen nicht-neuronalen Zellen befinden (Wessler et al., 1998). ACh wird durch die spezifische Azetylcholinesterase (AChE) und die weniger spezifische, im Plasma auftretende Butyrylcholinesterase (BChE) in Cholin und Acetat hydrolysiert (Wessler et al., 1998).

1.3 Zelluläre Funktionen des ACh im respiratorischen Epithel und anderen nicht-neuronalen Zellen

In der Zelle synthetisiertes ACh kann eine direkte Wirkung haben, indem es ohne Verlassen der Zelle als zytosolisches Signalmolekül oder durch intrazelluläre Rezeptoren mit intrazellulären Signal- und Strukturproteinen agiert (Wessler et al., 1988). Von nicht-neuronalen Zellen, wie z.B. Epithelzellen synthetisiertes ACh, kann eine autokrine Wirkung aufweisen, indem es mit den klassischen membranständigen muskarinischen und nikotinischen Rezeptoren der gleichen Zellen oder der benachbarten Zellen (parakrine Wirkung) agiert (Wessler et al., 1988). Die Translokation vom ACh moduliert einen Ionenfluss, der für die elektrischen Effekte an der Zellmembran verantwortlich sein kann (Wessler et al., 1998).

An nicht-neuronalen Zellen vermittelt ACh eine Reihe von zellulären Effekten. Bei humanen Epithelzellen wurde nachgewiesen, dass ACh eine regulative Wirkung auf den mitotischen Zyklus hat (Wessler et al., 1998). Laut Klapproth und Mitarbeiter reguliert ACh die Proliferation von Bronchialepithelzellen (Klapproth et al., 1997). Außerdem spielt die autokrine cholinerge Signaltransduktion eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Lunge und ist somit ein entscheidender Faktor sowohl bei der verringerten Lungenfunktion von Neugeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft Nikotin konsumiert haben (Hoo et al., 1998), als auch bei deren erhöhten Anfälligkeit für respiratorischen Krankheiten (Taylor und Wadsworth, 1987).

Ähnliche proliferative Wirkung und eine Beteiligung bei der Regeneration menschlicher Keratinozyten bei der Wundheilung sehen Grando und Mitarbeiter (Grando et al., 1993).

Eine wichtige Rolle spielt ACh auch bei der Regulation der Zilienaktivität (Sastry und Sadavongvivad, 1979; Wanner et al., 1996). Geringe Konzentrationen an ACh und an Physostigmin, einem Cholinesteraseinhibitor, können die Zilienaktivität in der Trachea des Kaninchens erhöhen (Kordik et al., 1952). ChAT kann ACh in der Transitzone zwischen den freien Zilien und dem Basalkörperchen bilden. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Beweis über die unterstützende Rolle des AChs in den Epithelzellen bei der Zilienaktivität (Reinheimer et al., 1997).

Nicht-neuronales ACh kann das Zytoskelett kontrollieren und reguliert damit Zellfunktionen wie Zellmigration und Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell

Kontakten. Dadurch übernimmt es die Kontrolle der physikalischen Barrierefunktion der Epithelzellen und der Interaktion zwischen den benachbarten Zellen (Wessler et al., 1998). So kommt es z.B bei den Trachealepithelzellen der Ratte nach Exposition von (+)-Tubocurarin, einem kompetitiven ACh-Agonisten, zu einer Ablösung der Zellen voneinander, sie schrumpfen und somit verbreitern sich die extrazellulären Räume (Klapproth et al., 1997). Selbst bei einer Erweiterung der extrazellulären Räume auf 10 µm zwischen den benachbarten Epithelzellen schlagen die Zilien weiter hoch koordiniert (Gheber et al., 1994).

Im Pankreas stimuliert ACh die Sekretion der exokrinen Drüsenzellen (Kasai und Augustine, 1990). Im Trophoblasten der Plazenta synthetisiertes und freigesetztes ACh reguliert die Cholin- und Aminosäurenresorption und ist somit direkt an der Ernährung des Fetus beteiligt (Rowell und Sastry, 1981).

Einen Einfluss hat ACh auch auf die Immunfunktion an Schleimhautoberflächen. Es reguliert die Mukussekretion und die Zusammensetzung der Flüssigkeit, die die Bronchien auskleidet (Wessler et al., 1998). ACh moduliert auch die Freisetzung von Zytokinen (z.B. dem Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierenden Faktor) und kontrolliert die Mastzellendegranulation, in dem es auch bei niedrigeren Konzentrationen die Histaminfreisetzung hemmt, und reduziert somit die mukosalen Entzündungen (Reinheimer et al., 1996, 1997).

Die Zirbeldrüse reguliert den menschlichen Tag-Nacht-Rhythmus durch eine tageslichtabhängige Melatoninsynthese, die einen nächtlichen Melatoninpeak zeigt, und ist somit für den Schlaf und Erholung des Organismus verantwortlich. Die Hormonsynthese und -freisetzung wird durch die Noradrenalinabgabe aus sympathischen Neuronen gesteuert. Nicht-neuronales ACh kann von Pinealozyten gebildet werden und die Ausschüttung von Noradrenalin hemmen und begrenzt somit die Melatoninsynthese (Wessler et al., 1998).

1.4 Nikotinische Azetylcholinrezeptoren (nAChR)

Die biologischen Effekte von ACh werden durch zwei Gruppen von Rezeptoren reguliert, die nach zwei selektiven Agonisten benannt sind. Zum einen sind das die nikotinischen Rezeptoren (nAChR) (benannt nach dem Alkaloid der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum*), und zum anderen die muskarinische Rezeptoren (mAChR) (benannt nach einem Alkaloid des Fliegenpilzes *Amanita muscaria*) (Starke, 1996).

Aufgrund der von ihnen ausgelösten physiologischen Reaktionen werden Rezeptoren in zwei großen Gruppen aufgeteilt. Die muskarinische Azetylcholinrezeptoren sind metabotrope Rezeptoren, die, nachdem sie einen Neurotransmitter gebunden haben, eine langsame biologische Antwort durch Interaktion mit den Vertretern der G-Protein-Familie vermitteln (Arias 1997).

Die nAChR gehören zu der Superfamilie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle (ionotrope Neurotransmitter-Rezeptoren). Zu diesen Rezeptoren gehören noch die GABA_A-, Glyzin- und Serotonin-5-HT₃-Rezeptoren (Dani und Bertrand, 2007). Die liganden-gesteuerten Kanäle sind eine Gruppe von Ionenkanälen, deren Öffnung durch das Binden eines chemischen Messengers gesteuert wird. So ermöglichen sie den passiven Ionenfluss durch die Zellmembran entlang der elektrochemischen Gradienten (Kalamida et al., 2007).

Zwei Gruppen von nAChR werden je nach Expressionsort unterschieden:

- 1) **muskuläre** nAChR, die in der motorischen Endplatte neuromuskuläre synaptische Transmission vermitteln, und
- 2) **neuronale** nAChR, vorhanden im peripheren und zentralen Nervensystem und beteiligt an der schnellen synaptischen Transmission (Hogg et al., 2003).

Die neuronalen Rezeptoren sind ein wichtiger therapeutischer Angriffspunkt, da sie die Nikotinabhängigkeit bei Rauchern vermitteln und Einfluss auf das Wahrnehmungsvermögen und die Aufmerksamkeit bei Patienten, z.B. mit Schizophrenie, Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson, nehmen können (Paterson und Nordberg, 2000). Die neuronalen Rezeptoren wurden auch in vielen nicht-neuronalen Zellen, wie z.B. Keratinozyten (Grando et al., 1995), Epithelzellen (Conti-Fine et al., 1995), Makrophagen, Lymphozyten, pulmonalen neuroendokrinen Zellen, Chondrozyten, Plazenta, und einigen Sinnesorganen, gefunden (Lukas et al., 1999).

Bis heute sind 17 nAChR Untereinheiten bestimmt worden ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ , ϵ). Mit Ausnahme der $\alpha 8$ -Untereinheit, die nur im Vogel exprimiert wird, wurden alle Untereinheiten bei Menschen und Säugetieren nachgewiesen (Millar und Gotti, 2009). Daraus ergeben sich viele mögliche Kombinationen, in denen die 17 Untereinheiten unterschiedlich zusammengestellt werden können. Es zeigt sich allerdings, dass Zusammenlagerung von Untereinheiten, ähnlich wie bei anderen oligomeren Ionenkanälen, ein hoch regulierter und geordneter Vorgang ist (Green und Millar,

1995). Die muskulären nAChR sind Aggregate aus fünf Untereinheiten (α , β , γ , δ oder ϵ), die um eine zentrale Kanalpore organisiert sind (Kalamida et al, 2007). Nikotinische Rezeptoren aus den Untereinheiten $\beta 1$, δ , ϵ , zusammen mit zwei $\alpha 1$ -Untereinheiten, gehören zu dem muskulären Typ und werden nur im adulten Muskelgewebe exprimiert. In embryonalem Gewebe und denerviertem Muskelgewebe dagegen fehlt die ϵ -Untereinheit und wird durch γ ersetzt, so dass die Zusammenstellung $(\alpha 1)_2$, $\beta 1$, γ , δ entsteht (Millar, 2003).

Der neuronale Typ nAChR besteht aus neun α -Untereinheiten ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) und drei β -Untereinheiten ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Gotti und Clementi, 1995).

Die große Vielfalt der nAChR ist bedingt durch die vielen Gene, die für die α - und β -Proteinuntereinheiten kodieren. Die Untereinheiten verleihen den Rezeptoren, die sie aufbauen, charakteristische funktionelle und strukturelle Eigenschaften (Lukas et al., 1999).

Man unterscheidet Homopolymere, bestehend aus fünf gleichen Untereinheiten, von Heteropolymeren, die aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind.

Die Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 8$ und $\alpha 9$ sind befähigt, funktionelle Homopentamere zu generieren (Millar, 2003). Die Heteropentamere sind im Gegensatz dazu aus zwei oder drei verschiedenen α - und β -Untereinheiten aufgebaut. So resultieren Rezeptoren mit unterschiedlichen Stöchiometrien, die Einfluss auf deren pharmakologische und funktionelle Eigenschaften haben (Millar und Gotti, 2009).

Die Homopentamere besitzen fünf identische ACh-Bindungsstellen pro Rezeptor, lokalisiert an der Schnittstelle zwischen zwei benachbarten α -Untereinheiten.

Im Gegensatz dazu verfügen die Heteropentamere über zwei α - und drei β -Untereinheiten und haben dementsprechend zwei ACh-Bindungsstellen, die an der Schnittstelle zwischen den α - und β -Untereinheiten liegen (Gotti und Clementi, 2004). Eine weitere Unterteilung der nAChR, basierend auf der Eigenschaft, verschiedene Liganden zu binden, erfolgt in 2 Gruppen: 1) **α -Bungarotoxin (α -BTX)-bindende nAChR**. Diese Gruppe kann entweder Homopentamere aus den $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ und/oder $\alpha 10$ Untereinheiten bilden oder Heteropentamere. 2) **nicht α -BTX-bindende nAChR**, die nur Heteropentamere aus den Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 7$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ bilden können und die Fähigkeit haben, Agonisten wie Nikotin mit höher Affinität zu binden (Lindstrom, 1997).

1.5 Struktur der neuronalen nAChR

Alle Untereinheiten eines neuronalen nAChRs können in folgende Elemente gegliedert werden:

- NH₂-terminale extrazelluläre Domäne mit einer Länge von ca. 210-220 Aminosäuren (AS). Diese beherbergen die Liganden-Bindestelle für Agonisten und kompetitive Antagonisten. In der extrazellulären Domäne befindet sich zusätzlich ein Cys-loop. Dabei handelt es sich um zwei Cysteinreste (Cys 128 und Cys 141), getrennt voneinander durch 13 AS. Diese Cys-Reste bilden über eine Disulfid-Bindung eine Schleife, die an die Agonisten-Bindung beteiligt ist.
- Vier kleine (ca. 15-20 AS lang) hydrophobe transmembrane Segmente (M1-M4) und zwei kleine hydrophile Schleifen, die die Segmente M1 mit M2 und M2 mit M3 miteinander verbinden. Das zweite transmembrane Segment M2 legt den Ionenkanal aus (Wonnacott und Barik, 2007).
- Große intrazelluläre Schleife (100-150 AS) zwischen den Segmenten M3 und M4, die ins Zellinnere ragt und Phosphorylierungsstellen hat.
- Eine kleine COOH-terminale, hydrophile, extrazelluläre Domäne (4-28 AS lang) (Kalamida, 2007).

Die fünf Untereinheiten eines jeden nAChR sind rosettenförmig angeordnet und bilden somit eine zentrale Pore, die den Ionenkanal darstellt. Wenn zwei ACh-Moleküle an die α -Untereinheiten eines Homopentamers binden, kommt es zu Öffnung des kationspezifischen Kanals für etwa 1 μ s, bedingt durch die Rotation der M2-Helix innerhalb der α -Untereinheit. Durch die Öffnung des Kanals strömen selektiv Ionen (meist monovalente Ionen wie Na⁺, K⁺ und mit weniger Affinität bivalente Ionen wie Ca²⁺) entlang ihres chemischen Gradienten und verursachen somit eine Membranpotenzialänderung (Wonnacott und Barik, 2007).

Die Eigenschaft Ionenselektivität des Kanals (d.h. nur Ionen mit entsprechenden Durchmesser und positiver Ladung können den Kanal durchqueren und in die Zelle gelangen) ist bedingt durch die Anlagerung verschiedener Untereinheiten, Durchmesser des Kanals und die der Ionenladungen komplementären Ladungen der Kanalwand aufbauende Aminosäuren, die ins Kanallumen ragen. Charakteristisch für die nAChR ist das Phänomen „*inward rectification*“. Dabei können die Ionen bei einem positiven Membranpotenzial nicht ins Zellinnere gelangen (Dani und Bertrand, 2007).

1.6 Funktionsweise der nAChR

Die nAChR sind Ionenkanäle, die in inaktivem Zustand geschlossen und für Ionen nicht durchlässig sind. Nach Binden eines Agonisten an den Rezeptor öffnet sich der Kanal, es kommt zu einem selektiven Ionenfluss, gefolgt durch eine Membranpotenzialänderung (Unwin et al., 2003) mit nachfolgender Depolarisation der Zellmembran und Signaltransmission (Ochoa et al., 1998).

Die nikotinischen ACh-Rezeptoren durchlaufen drei ineinander überführbare Konformationsstadien. Man unterscheidet:

- Ruhestadium oder aktivierbares Stadium
- aktives, geöffnetes Stadium
- desensibilisiertes Stadium.

Im Ruhestadium liegt der Rezeptor in Abwesenheit eines Liganden vor und ist am stabilsten. Seine Pore ist dann geschlossen. Es findet keinen Ionenfluss statt. Wenn ein spezifischer Agonist, wie z.B. ACh oder Nikotin, an die extrazelluläre Domäne eines Rezeptors bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung mit einer Rotation der α -Helices des M2-Segments einer Untereinheit, der Kanal öffnet sich ca. 3 Å (Wonnacott und Barik, 2007) und geht in das aktive Stadium über (Unwin et al., 2003). Ist der Rezeptor einigen Milisekunden bis Minuten dem Agonisten exponiert, schließt sich der Kanal wieder und es kommt zur Desensibilisierung des Rezeptors. Es findet keinen Ionenfluss ins Zellinnere mehr statt. Dieses Stadium ist das stabilste, wenn ein Agonisten gebunden ist (Wilson und Karlin, 2001). Werden die nAChR chronisch über längere Zeiten (Minuten bis Stunden) einem Agonisten ausgesetzt, werden die Rezeptoren funktionell inaktiviert. Der Ionenfluss ist dann unterbunden. Dieser Zustand ist bedingt durch die Phosphorylierung der Untereinheiten und ist irreversibel (Olale et al., 1997).

1.7 Beeinflussbarkeit der nAChR durch Pharmaka

Die Interaktion zwischen einem Liganden und einem nAChR kann unterschiedliche Effekte am Rezeptor auslösen.

ACh ist ein physiologischer Ligand, der alle nAChR aktiviert. Der Rezeptorkanal öffnet sich und es erfolgt ein Einstrom von Ionen ins Zellinnere (Wonnacott, 2007). Zusätzlich existieren Pharmaka wie Nikotin, die die Wirkung von ACh imitieren und mit ihm um seine Bindungsstelle an das aktive Zentrum konkurrieren. Solche Liganden werden als *kompetitive Agonisten* bezeichnet. Nikotin bindet mit unterschiedlicher Affinität an die verschiedenen Untereinheiten ($\alpha 4 > \alpha 3 > \alpha 7$) (Arneric und Holladay, 2000). Eine Ausnahme machen die Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ (in Kombination mit $\alpha 9$). Bei diesen wirkt Nikotin als Antagonist (Wonnacott, 2007).

Pharmaka, die mit einem Liganden um die Bindung ans aktive Zentrum eines Rezeptors oder in dessen unmittelbarer Nähe konkurrieren und damit die Ligandenbindung inhibieren, bilden die Gruppe der *kompetitiven Antagonisten*. Dazu gehören das Schlangengift α -Bungarotoxin (α -BTX), das Gift der Conus-Schnecken α -Conotoxin (α -CTX) und Dihydro- β -Erythroidin (DH β E). Sie können reversibel den Rezeptor blockieren und bei Erhöhung der Agonistenkonzentration wird ihre Wirkung unterbunden (Wonnacott, 2007).

Allosterische Modulatoren gehören zu den nicht-kompetitiven Liganden. Diese sind Substanzen, die ihre Wirkung auf einzelne, vom aktiven Zentrum entfernte (allosterische) Interaktionsstellen ausüben. Sie ändern die Agonist-Rezeptor Affinität oder die intrinsischen Eigenschaften des Rezeptors (Yoshimura et al., 2007). Einige der allosterischen Modulatoren haben hemmende Wirkung auf die Rezeptoren und werden als *negative allosterische Modulatoren* bezeichnet. Solche sind Mecamylamin (MEC). Bivalente Kationen wie Ca^{2+} und Zn^{2+} können bei allosterischer Bindung die Agonistenwirkung verstärken und werden *positive allosterische Modulatoren* genannt (Wonnacott, 2007).

1.8 Ziel der Arbeit

Zigarettenrauch ist ein Risikofaktor für die Entstehung von chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und Lungenkarzinomen.

Nikotin, ein tertiäres Alkaloid der Tabakpflanze, ist ein wichtiger chemisch und pharmakologisch aktiver Bestandteil des Tabakrauchs. Aufgrund seiner Lipophilie kann Nikotin die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren und somit bei chronischer Exposition Abhängigkeit verursachen (Katzung, 1998).

Nikotin hat ein breites Spektrum biologischer Wirkungen-einige wirken sich positiv auf den menschlichen Körper aus. Nikotin wirkt über neuronale nikotinische Rezeptoren auf die kognitive und motorische Funktion und auf den zerebralen Blutfluss (Leopold et al., 2009). Viele Studien haben die antiinflammatorische Eigenschaften des Nikotins beschrieben, z.B. bei Typ I-Diabetes im Tiermodell (Mabley et al., 2002) oder bei der Behandlung der Colitis ulcerosa beim Menschen (Sandborn, 1999). In vitro reduziert Nikotin die Freisetzung von IL-1 β und TNF aus Alveolarmakrophagen (Georig et al., 1992), Lymphozytenproliferation (Kalra et al., 2000) und Expression von CD28-Molekülen in T-Zellen (Savage et al., 1991) und von B7-Molekülen in Alveolarmakrophagen (Blanchet et al., 2004) und wirkt damit antiinflammatorisch.

Bei der Exposition gegenüber Zigarettenrauch kommt es zu wichtigen biologischen Veränderungen im respiratorischen Epithel. Durch Tabakkonsum erfolgt eine Reduktion der mukoziliären Clearance und es kommt somit zu einer gestörten Koordination des Zilienschlags und Abschwächung des Schutzmechanismus gegenüber eingeatmeten Partikeln und Pathogenen. Dadurch steigt das Risiko für Infektionen der Atemwege und für die Entstehung von COPD und bronchogenen Karzinomen (Leopold et al., 2009). Unklar ist, ob diese Wirkung auch auf Nikotin zurückzuführen ist.

Entsprechend war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, diesen Aspekt abzuklären.

Angewendet wurde eine von Klein und Mitarbeiter (2008) etablierte Messmethode, mit der Messungen der PTG entlang der gesamten Länge der Trachea, unabhängig von der Anwesenheit einer Mukusschicht, durchgeführt werden können. Es wurden dabei drei Fragenkomplexe bearbeitet:

1. Bewirkt Nikotinzugabe eine Änderung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) in der Mastrachea?
2. Falls ja, sind diese Effekte durch nAChR-Antagonisten (α -CTX MII und MEC) hemmbar?
3. Ist der $\alpha 7$ nAChR daran beteiligt? Untersuchung an $nAChR_{\alpha 7}^{-/-}$ und entsprechenden Wildtyp (WT)-Mäuse?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der verwendeten Substanzen und deren Hersteller.

Substanzen	Hersteller
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Ethanol absolut	Riedel de Haën AG, Seelze, Deutschland
Glukose	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid-2-Hydrat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-6-Hydrat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 1: *Verwendete Chemikalien*

2.1.2 Pharmaka

Die folgende Tabelle stellt die verwendete Pharmaka und deren Hersteller dar, die für die Versuche benötigt wurden.

Pharmakon	Firma	Konzentration in M
Adenosin-5'-Triphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	10^{-4}
α -Conotoxin MII	Tocris Bioscience, Missouri, USA	10^{-3}
Mecamylamin	Sigma, Missouri, USA	10^{-4}
Nikotin-Hydrogentartarat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}

Tab. 2: *Verwendete Pharmaka*

2.1.3 Puffer und Lösungen

Hepes-Ringer-Puffer, pH 7,4

Folgende Substanzen wurden für die Herstellung von 1 Liter Hepes-Ringer-Puffer verwendet:

- 0,418 g Kaliumchlorid (KCl)
- 7,97 g Natriumchlorid (NaCl)
- 1,98 g Glukose
- 2,38 g HEPES
- 1,0 ml 1 M Magnesiumchlorid-6-Hydratlösung ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
- 2,2 ml 1 M Kalziumchlorid-2-Hydratlösung ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

Der Puffer wurde mit aqua dest auf 1 Liter aufgefüllt. Durch die Zugabe von 23 ml einer 1 M Natronlauge (1 M NaOH) erfolgte die Einstellung eines pH-Wertes von 7,4. Die so angefertigte Pufferlösung wurde bei einer Temperatur von 4°C gelagert.

Sylgard 184

Zum Herstellen des Sylgardgels 184 wurden 9 Teile Sylgard 184 Base (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und 1 Teil Sylgard 184 Härter (Dow Corning GmbH,

Wiesbaden, Deutschland) abgewogen und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer zusammengemischt. Das Gemisch wurde 2 Stunden in einen Exsikkator gestellt, der an einer Vakuumpumpe angeschlossen war, um die so entstandenen Luftbläschen zu entfernen. Auf dem Boden eines 0,17 mm dicken Delta T-Dish wurden 1,2 ml von dem Gel mittig aufgetragen. In einem Wärmeschränk erfolgte die Aushärtung bei 65°C über die Nacht.

2.1.4 Geräte und Laborbedarf

Die folgende Tabelle zeigt die Materialien und Geräte, die für die Durchführung der Versuche zur Messung der PTG verwendet wurden, und deren Hersteller.

Laborbedarf/Geräte	Hersteller	
Delta T-Kulturschälchen 0,17 mm Bodendicke, klar	Bioptechs	Butler, PA, USA
Minutien, Größe 15	Fiebig Lehrmittel	Berlin, Deutschland
Dynabeads	Dynal Biotech	Oslo, Norwegen
Sylgard 184	Dow Corning GmbH	Wiesbaden, Deutschland
Lichtmikroskop BX 51WI	Olympus GmbH	Hamburg, Deutschland
Objektiv UMPlan FI 20x/0.50W	Olympus GmbH	Hamburg, Deutschland
CMOS Kamera	EHD Imaging GmbH	Damme, Deutschland
Software: Image-Pro Plus Analyzer 6.2	Media Cybernetics Inc.	Silver Spring, USA

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.5 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Mäuse beiderlei Geschlechts der Zuchtlinie C57Bl/6 sowie gendefiziente Tiere ($\alpha 7$ -Untereinheit des nAChR) und deren entsprechenden Wildtyp (WT)-Stamm verwendet. Sie stammten sowohl aus der Zucht des zentralen Tierlabors der Justus-Liebig-Universität Gießen als auch aus einer spezifiziert pathogen-freien

Haltung (SPF; Harlan Winkelmann, Borchern). Alle verwendeten Tiere hatten ein Alter von mindestens 15 Wochen und wurden durch eine Überdosis Isofluran (Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) getötet.

2.2 Methoden

2.2.1 Organentnahme

Die getöteten Mäuse wurden in Rückenlage an den Extremitäten fixiert. Durch einen Hautschnitt im Bereich des Beckens wurde die Bauchhöhle geöffnet und die Aorta abdominalis durchtrennt. Dies führte zum Ausbluten der Tiere. Anschließend erfolgte die Thoraxeröffnung durch Entfernen des Diaphragmas. Die Rippen wurden zusammen mit dem Brustbein entfernt. Die Trachea wurde von umgebendem Fettgewebe, Blutgefäßen und anhängendem Ösophagus freipräpariert und mit einem Schnitt kaudal des Kehlkopfes sowie einem Schnitt kranial der Bifurcatio tracheae abgetrennt.

Gleich nach der Entnahme wurde die Trachea mittig in ein mit kalter HEPES-Ringer-Lösung (4-8°C) gefülltes Delta T-Kulturschälchen gelegt. Dabei wurde der Muskulus trachealis (M.trachealis) nach oben ausgerichtet. An den beiden Enden erfolgte die Fixierung der Trachea mit jeweils einer Minutie, Größe 15, in natürlicher Streckung. Im Delta T-Kulturschälchen erfolgte die Entfernung von Präparierresten, die ein möglicher Störfaktor bei der nachfolgenden Messung sein könnten. Der M. trachealis wurde der Länge nach aufgeschnitten. Anschließend wurde die vorhandene kalte HEPES-Ringer-Lösung gegen eine 1,5 ml einer auf 37°C vorgewärmte HEPES-Ringer-Lösung ausgetauscht. Das so vorbereitete Delta T-Kulturschälchen wurde in einen Halter unter dem Mikroskop Olympus BX51WI eingespannt. In der vorgewärmten HEPES-Ringer-Lösung wurde ein 20er Wasserimmersionsobjektiv (UMPlan Fl 20x/0.50W, Olympus, Hamburg, Deutschland) eingetaucht. Dadurch konnte ein Temperaturabfall zu Beginn der Versuche vermieden. Der Halter war beidseitig über Thermostatifühler mit einem integrierten Heizsystem (Biopetechs) verbunden, welches über die gesamte Versuchsdauer eine Temperatur von 30°C erhielt (Abb. 1).

Um eine optimale konstante Temperatur der Hepes-Ringer-Lösung während der gesamten Versuchsdauer zu gewährleisten, wurden vor den Versuchen bei den

verwendeten Delta T-Kulturschälchen Vormessungen am Thermostat vorgenommen. Dabei wurden nur diejenigen T-Schälchen für die spätere Versuche benutzt, die eine Temperatur von 30°C über 2 Stunden aufwiesen.

Nachfolgend wurden 10 min vor dem Versuchsbeginn 2,3 µl Dynabeads (Polystyrenkügelchen mit einem Durchmesser von ca. 2,8 µm, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) seitlich der aufgespannten Trachea hineinpipettiert und mehrmals vorsichtig mittels einer Pipette durchmischt. An das Mikroskop oberhalb des Okulars war eine monochrome CMOS Kamera (EHD Imaging GmbH, Damme, Deutschland) angeschlossen, die die in bestimmten Zeitabschnitten aufgenommenen Bilder an einen Computer weiter übertrug.

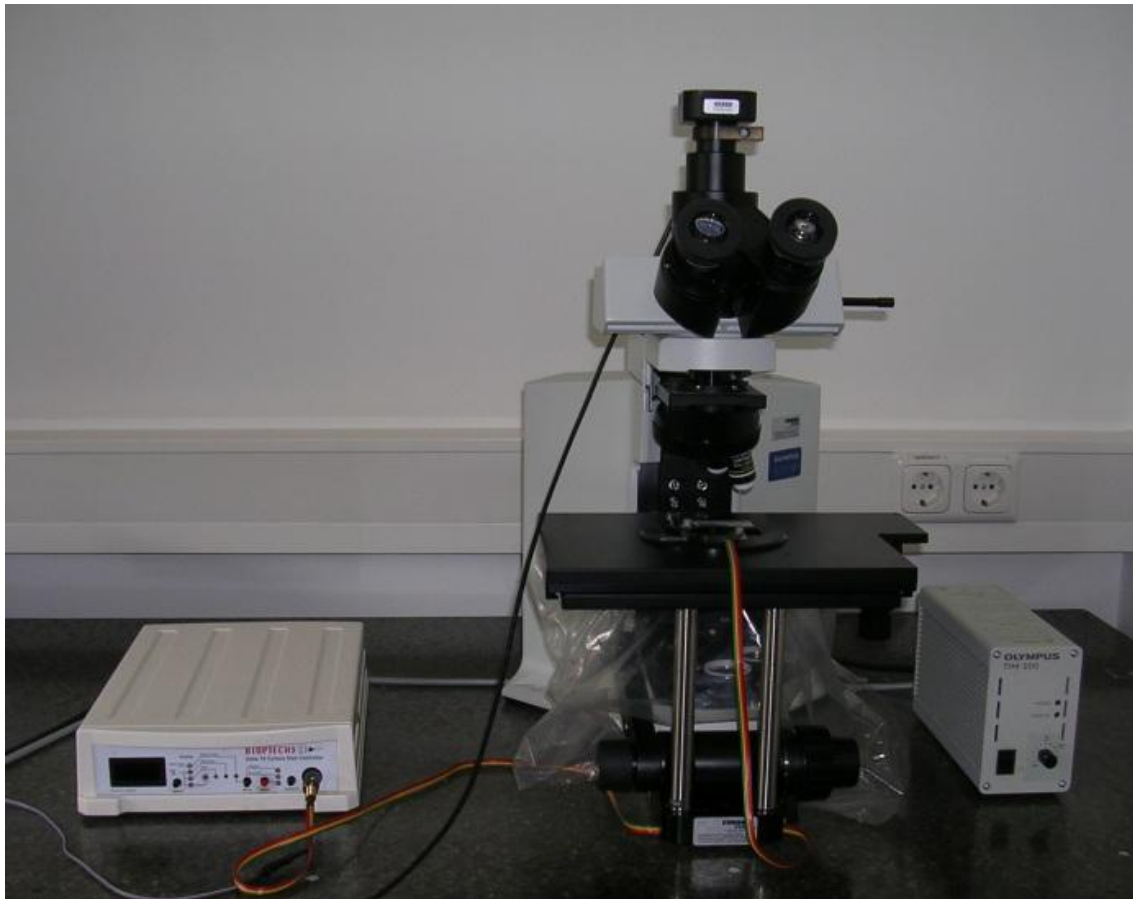


Abb. 1: *Darstellung der Messapparatur*

2.2.2 Messungen der Partikeltransportgeschwindigkeit

2.2.2.1 Vorbereitung des Mikroskops

Zunächst wurde ein Delta T-Kulturschälchen mit destilliertem Wasser aufgefüllt und unter das Mikroskop eingespannt. Bei eingeschalteter Lichtquelle wurde das 20er Objektiv eingetaucht, um entsprechend vorgewärmt zu werden.

2.2.2.2 Messungen der PTG der Trachea

Die Messungen wurden mit der Imaginganalysesoftware „StreamPix“ (Norix Inc., Montreal, Kanada) durchgeführt und mit dem Softwareprogramm „Image-Pro Plus Analyzer 6.2“ (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) ausgewertet.

Für die Messungen wurde ein Trachealabschnitt zwischen zwei Knorpelspannen ausgesucht, der möglichst in der Mitte der Trachea lag und frei von Blutgefäßen war. Damit sich keine der Dynabeads am Boden des Sylgardgels ablagern, erfolgte 30 s vor jeder Messung eine zweimalige Durchmischung der HEPES-Ringer-Lösung mit Hilfe der Pipette.

Die Bilder wurden bei einer Auflösung von 1280 x 960 Bildpunkten und zu bestimmten Zeitmesspunkten (siehe Protokolle) aufgenommen. Zu den entsprechenden Messpunkten wurden 200 Bilder pro Film (Zeit zwischen 2 Filmen: 84 ms) mit einer 20 MHz Aufnahmefrequenz gemacht.

2.2.2.3 Versuche an C57Bl/6 Mäusen

Bei den Versuchen zur Überprüfung der Desensibilisierung der nAChR wurde Nikotin in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Dabei wurden bei jedem Versuch drei aufeinanderfolgenden Applikationen gleicher Konzentration hinzupipettiert. Es wurden folgenden Konzentrationen eingesetzt: 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M. Die Versuche wurden nach folgendem Schema durchgeführt (Abb. 2):

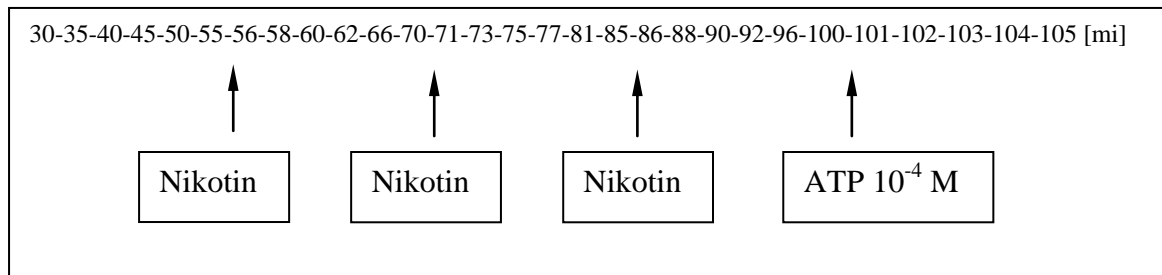


Abb. 2: Versuchsprotokoll zur Überprüfung der Desensibilisierung der nAChR bei Nikotinzugabe an C57Bl/6 Mäusen

2.2.2.4 Versuche mit Agonisten und Antagonisten der nAChR

Die Messungen an der Trachea erfolgten 30 min nach der Tötung des Tieres und der Fixierung der Trachea. Es wurde die Wirkung des nikotinischen Rezeptoragonisten Nikotin und der Rezeptorantagonisten α -CTX MII bzw. MEC auf die PTG gemessen.

2.2.2.5 Versuche mit Nikotin in einer Endkonzentration von 10^{-4} M bei nAChR $\alpha 7$ -/- Mäusen und entsprechendem WT-Stamm

Für diese Versuche wurden nAChR $\alpha 7$ -Knock-out (KO)-Mäuse und ihr korrespondierender WT-Stamm benutzt.

Zunächst wurden 6 Aufnahmen in Abständen von 5 min zur Bestimmung der Basisgeschwindigkeit gemacht. Nach der 55. min erfolgte die Zugabe von 1,5 μ l Nikotin (Endkonzentration 10^{-4} M) und es erfolgten 4 Aufnahmen in Abständen von 2 min und darauf folgend 2 Aufnahmen in Abständen von 4 min. Zur Überprüfung der Vitalität der Trachea erfolgte 5 min vor Messende die Zugabe von 1,5 μ l ATP (Endkonzentration 10^{-4} M) und es wurden entsprechend 5 Aufnahmen in Abständen von 1 min gemacht (Abb. 3).

Für die gleichmäßige Verteilung der Dynabeads und der zugegebenen Substanz wurde der sich im Kulturschälchen befindliche Puffer vorsichtig mit einer Pipette vermischt. Um durch das Mischen entstandenen Bewegungen der Flüssigkeit und dadurch eine Verfälschung in der Messung der PTG zu minimieren, erfolgten die Aufnahmen erst 1 min nach dem Mischen.

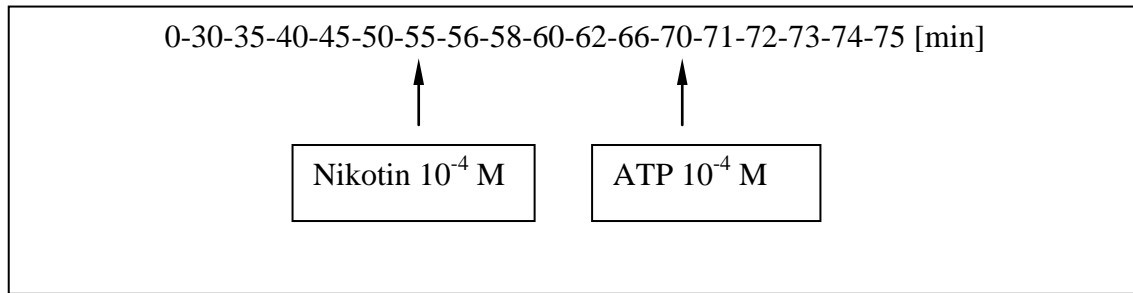


Abb. 3: Versuchsprotokoll zur Messung der PTG nach Zugabe von Nikotin und ATP

2.2.2.6 Versuche mit den Antagonisten α -CTX MII (Endkonzentration 10⁻³ M) bzw. MEC (Endkonzentration 10⁻⁴ M) und die entsprechenden Kontrollen bei C57/Bl6 Mäusen

Bei den C57/Bl6-Mäusen wurde nach der 55. min 1,5 μ l α -CTX MII bzw. MEC hinzupipettiert und es erfolgten 3 Aufnahmen in Abständen von 2 min. Gleich im Anschluss wurde 1,5 μ l Nikotin (Endkonzentration von 10⁻⁴ M) zugegeben. Es erfolgten 4 Aufnahmen in Abständen von 2 min und 2 Aufnahmen in Abständen von 4 min. Abschließend erfolgte 5 min vor dem Messenden die Vitalitätskontrolle mit 1,5 μ l ATP-Lösung (Endkonzentration 10⁻⁴ M) (Abb. 4).

Anstelle von α -CTX MII bzw. MEC wurde als Negativkontrolle nach dem gleichen Protokollverlauf das für die Antagonisten verwendete Lösungsmittel Wasser eingesetzt.

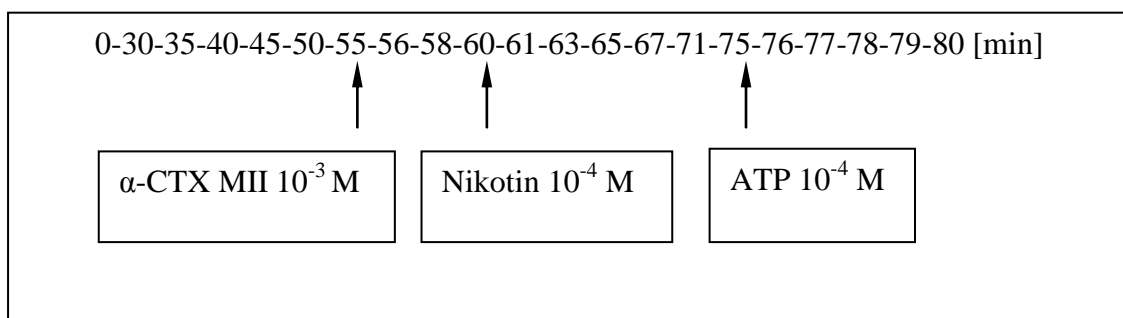


Abb. 4: Versuchsprotokoll zur Messung der PTG nach Zugabe von α -CTX MII und Nikotin

2.2.3 Auswertung

Die Auswertung und Berechnung der durchschnittlichen PTG erfolgte mit Hilfe des Programms Image-Pro Plus Analyzer 6.2 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA). Im Folgenden werden die Schritte der Auswertung für einen einzelnen Zeitpunkt dargestellt. Für die Messung wurde ein Abschnitt zwischen zwei Knorpelspangen ausgesucht, möglichst frei von Blutgefäßen und mit den hinzupipettierte Dynabeads aufgenommen (Abb. 7A). Von allen aufgenommenen Bildern eines Filmes wurde zunächst ein Durchschnittsbild erzeugt und dieses anschließend von jedem Bild abgezogen, um so nicht veränderliche Teile des Bildes von den sich bewegenden Teilen zu differenzieren. Alle Bilder wurden kopiert und anschließend von 12 Bit-Graustufenbildern automatisch auf 8 Bit umgewandelt (Abb. 7B). Für die so entstandenen binären Bilder wurde ein Schwellenwert zwischen 500 und 1000 gewählt. Damit wurden die sichtbaren Dynabeads in Weiß und der Hintergrund in Schwarz dargestellt. Dadurch konnte das Softwareprogramm den zurückgelegten Weg d und die PTG v ($v=d/t_2-t_1$, t = Zeit in [min]) der einzelnen Partikel errechnen.

Bei dem zurückgelegten Weg ist zu unterscheiden zwischen der idealen Distanz (die Distanz zwischen Start- und Endpunkt) und akkumulierter Distanz D (die Summe aller Distanzen vom Startpunkt aus) (Abb. 5a und 5b). Aus diesen Größen wurden ermittelt:

- 1) MW=Mittelwert der Durchschnittsgeschwindigkeit der Partikel
- 2) MD=Medianwert der Durchschnittsgeschwindigkeit der Partikel
- 3) MW<1.15=Mittelwert der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel, deren zurückgelegter Weg nicht mehr als 15% von der idealen Distanz abweicht
- 4) MD<1.15=Median der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel, deren zurückgelegter Weg nicht mehr als 15% von der idealen Distanz abweicht

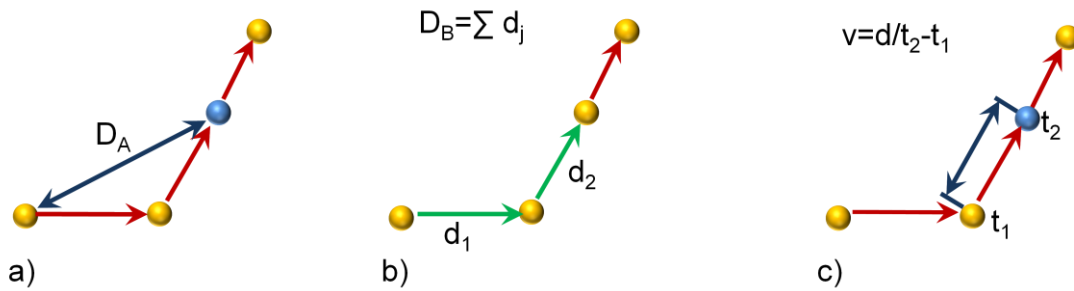


Abb. 5: Graphische Darstellung der **a)** Distanz zum Ausgangspunkt D_A (ideale Distanz), **b)** akkumulierten Distanz D_B und **c)** der Geschwindigkeit v . (modifiziert nach der Software „Image Pro Plus Analyzer 6.2“)

Um den MW bzw. $MW < 1.15$ der Durchschnittsgeschwindigkeit zu ermitteln, wurden pro Messpunkt die Tracks der Partikel ausgewählt, die in 10 aufeinanderfolgenden Bildern sichtbar waren (Abb. 7D). Zusätzlich wurden nur solche Partikel in die Auswertung aufgenommen, deren zurückgelegter Weg nicht mehr als 15% vom idealen Weg (direkter Weg zwischen Start- und Endpunkt) ($Q < 1.15$) abwichen. Dadurch wurden die sich in Kreis drehenden oder liegen gebliebenen Partikeln ausgeschlossen (Abb. 6).

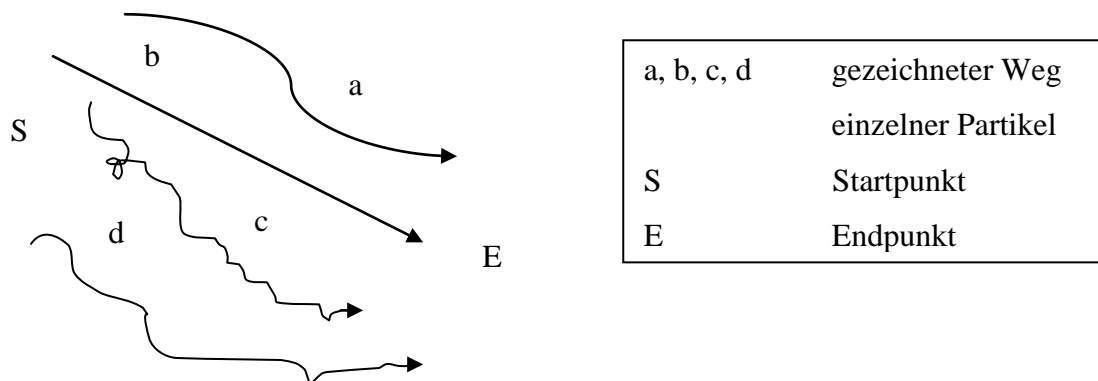


Abb. 6: Darstellung der möglichen Wegstrecken einzelner Partikel, die als Auswertekriterium dienen. Partikel a und b werden in die Auswertung einbezogen; Partikel c und d weichen mehr als 15% vom idealen Weg ab und werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die gewonnenen Werte wurden in eine Excel-Tabelle eingefügt. Dabei wurde die Durchschnittsgeschwindigkeit MW und $MW < 1.15$ der transportierten Partikel in $\mu\text{m/s}$

(x-Achse) gegen die Zeit in min (y-Achse) nach Entnahme der Trachea dargestellt. Die Durchschnittsgeschwindigkeit wird von der Software in einer spezifischen Einheit für das Programm angegeben. Damit sie in $\mu\text{m/s}$ angegeben werden kann, musste der Wert mit einem für das Objektiv errechneten Faktor multipliziert werden. Für das hier verwendeten 20er Objektiv betrug er 0,0073885.

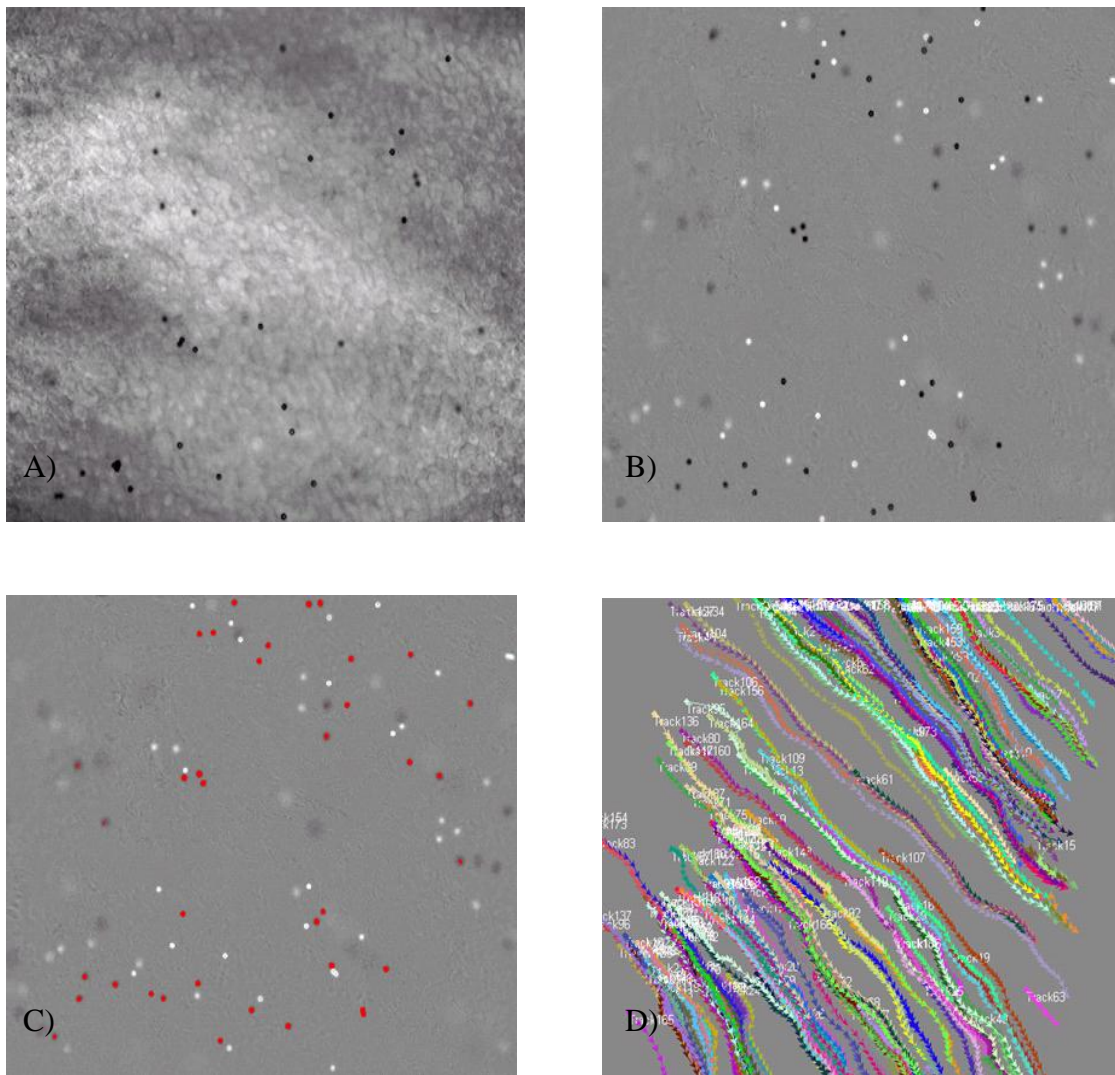


Abb. 7: Darstellung der Trachealoberfläche mit Dynabeads und der Schritte der Bildverarbeitung zur Ermittlung der PTG mit dem Softwareprogramm „Image-Pro Plus“.

- A) Trachealoberfläche mit Dynabeads (mit einem Durchmesser von $2,8 \mu\text{m}$).
- B) Elektronisch ermitteltes Durchschnittsbild von allen Bildern eines Films nach Graustufenumwandlung von 12 Bit in 8 Bit.
- C) Markierte Dynabeads in roter Farbe dargestellt.
- D) Tracks (zurückgelegter Weg) eines jeden Partikels innerhalb eines Films. Dargestellt in unterschiedlicher Farben.

2.2.4 Statistik

Für die statistische Datenauswertung wurde die Software SPSS 17.0 (SPSS Inc. Headquarters Chicago Illinois, USA) verwendet. Um festzustellen, ob die durch Nikotin bedingte Steigerung der PTS in der Grundgesamtheit normal verteilt ist, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test benutzt. Dieser zeigte keinen signifikanten Unterschied der Datenverteilung zur Normalverteilung. Anschließend wurden sowohl explorative Datenanalysen als auch ANOVA (bei $K > 2$ Gruppen) bzw. t-Test (bei $K = 2$ Gruppen) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant und bei $p \leq 0,001$ als hoch signifikant bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Konzentrationsabhängigkeit und Desensibilisierung der Nikotinwirkung bei C57Bl/6 Mäusen

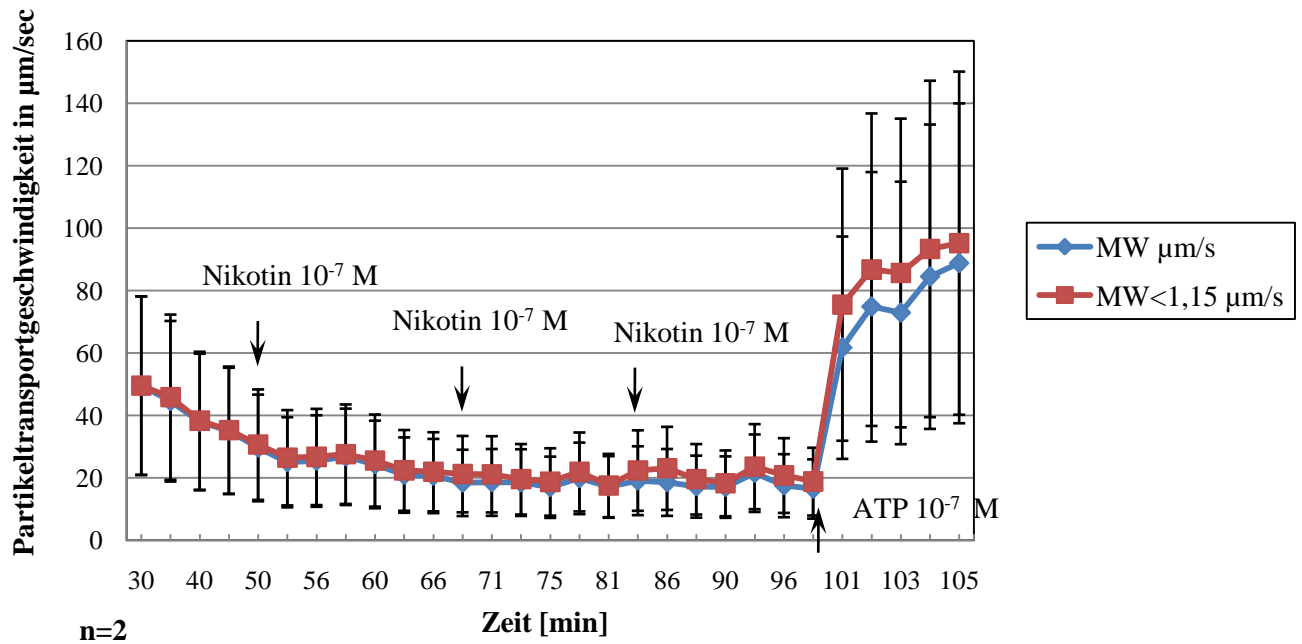


Abb. 8: Einfluss von 10^{-7} M Nikotin auf die PTG.

Drei aufeinanderfolgende Applikationen von Nikotin in einer Konzentration von 10^{-7} M bewirkten keine Änderung der PTG. Die Zugabe von ATP in der 100. Minute erhöhte deutlich die PTG, was die Vitalität der Präparation zeigte (Abb. 8).

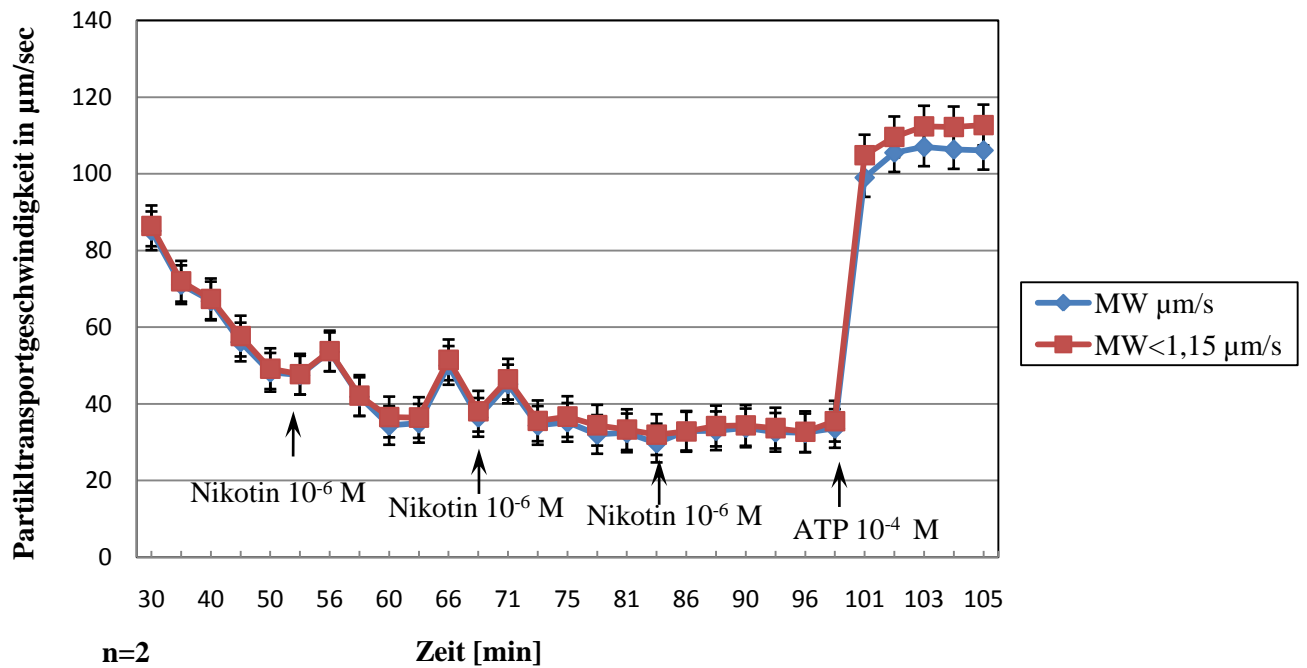


Abb. 9: Einfluss von 10^{-6} M Nikotin auf die PTG.

Bei der ersten Zugabe von 10^{-6} M Nikotin erfolgte eine leichte Steigerung der PTG. Nach der zweiten Nikotin-Zugabe in der 70. min stieg die Geschwindigkeit ebenfalls kurzfristig an. Eine weitere Zugabe von Nikotin 10^{-6} M in der 85. min verursachte keine weitere Änderung der PTG. Durch die anschließende ATP-Zugabe in der 100. min konnte die Vitalität der Trachea gezeigt werden (Abb. 9).

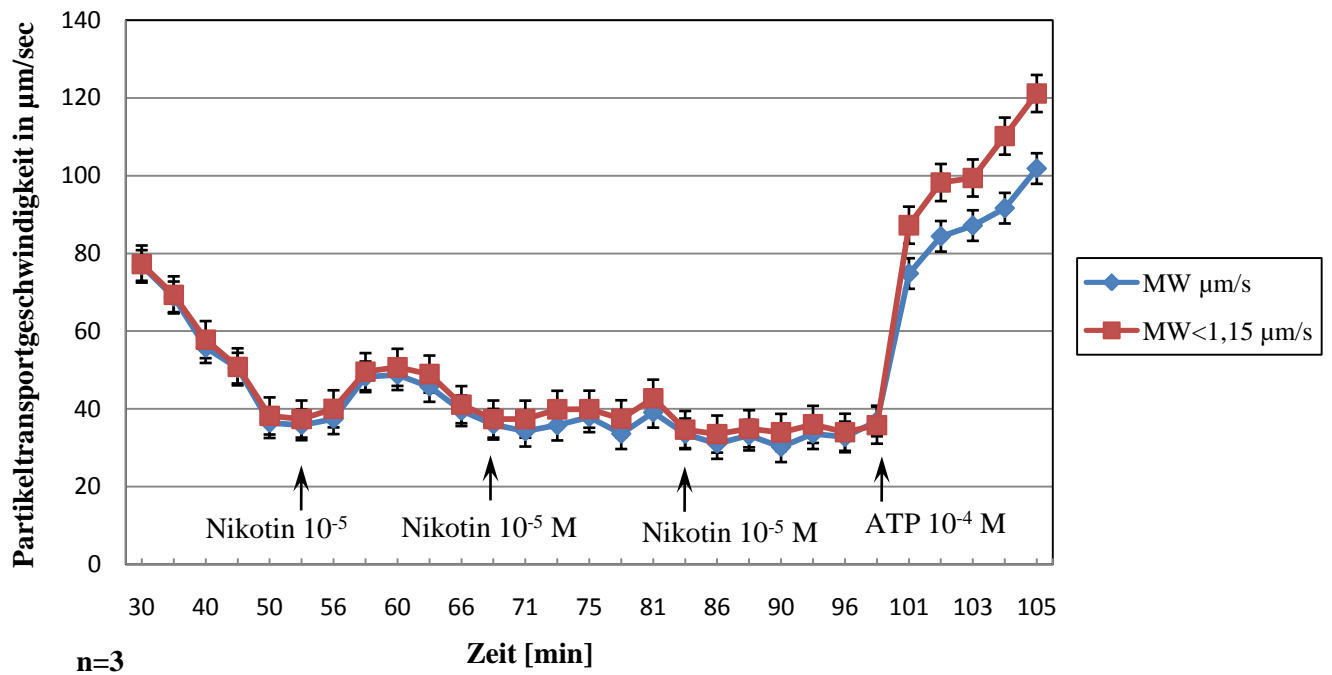


Abb. 10: Einfluss von 10^{-5} M Nikotin auf die PTG.

Bei der ersten Zugabe von 10^{-5} M Nikotin erfolgte eine Steigerung der PTG, die bei erneuter Zugabe nicht eindeutig wiederholbar war. Die Vitalität der Präparation wurde durch die Zugabe von ATP in der 100. min überprüft (Abb. 10).

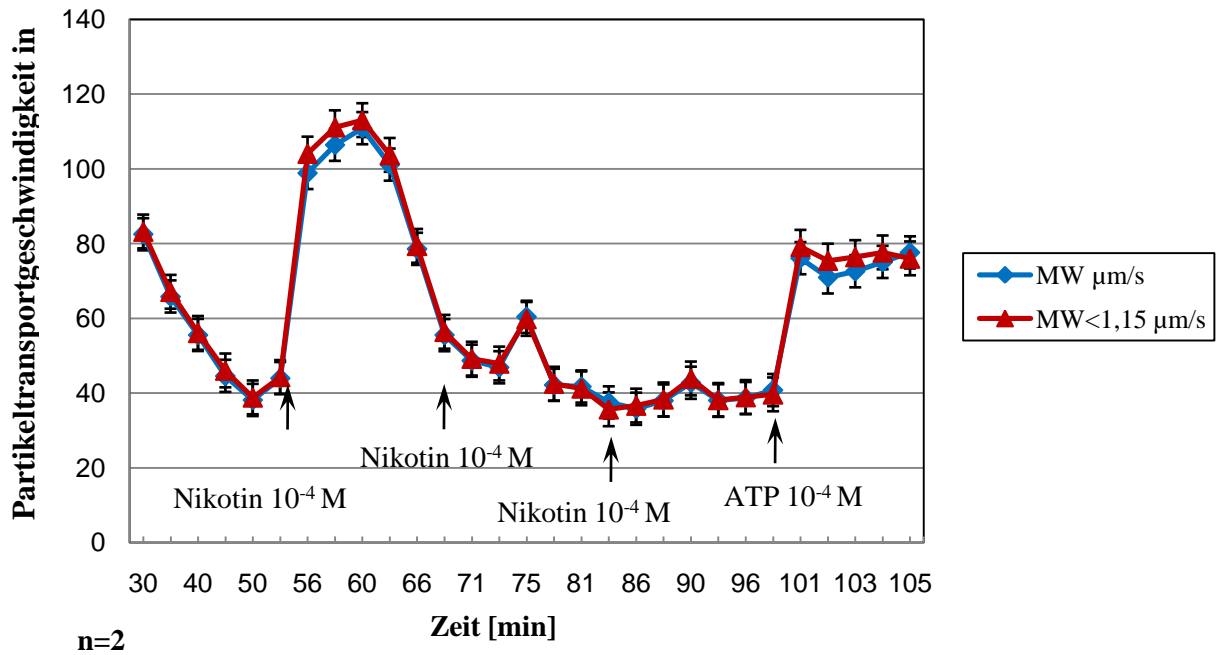


Abb. 11: Einfluss von 10^{-4} M Nikotin auf die PTG.

Der erste Stimulus mit 10^{-4} M Nikotin führte zu einer beträchtlichen Steigerung der PTG, die innerhalb der nächsten 15 min wieder sank. Bei der nachfolgenden Zugabe von Nikotin in der 70. min erfolgte nur noch eine leichte Erhöhung und fast keine mehr bei der dritten Nikotinapplikation. Die Zugabe von ATP in der 100. min diente der Vitalitätsüberprüfung der Präparation (Abb. 11).

3.2 Messung der PTG in der Trachea nach Zugabe von Nikotin (10^{-4} M) und ATP (10^{-4} M)

3.2.1 PTG nach Zugabe von Nikotin bei C57Bl/6 Mäusen

Der Messbeginn erfolgte in der 30. min. Während der nächsten 25 min erfolgten in Abständen von 5 min Aufnahmen der PTG (Abb.10). Dabei wurde eine signifikante Abnahme der Geschwindigkeit von $44,33 \pm 5,41 \text{ } \mu\text{m/s}$ [$\bar{X} \pm \text{SEM}$] auf $29,81 \pm 2,90 \text{ } \mu\text{m/s}$ festgestellt ($p=0,046$). Gleich nach der Aufnahme in der 55. min wurde Nikotin hinzupipettiert (Endkonzentration von 10^{-4} M). Innerhalb der ersten Minute wurde eine signifikante Steigerung ($p=0,016$) der PTG auf $98,45 \pm 11,81 \text{ } \mu\text{m/s}$ festgestellt. In den nächsten 6 Aufnahmen, die jede 2. min erfolgten, sanken die Werte auf $50,75 \pm 7,86 \text{ } \mu\text{m/s}$. Um die Vitalität der Trachea zu überprüfen wurde in der 70. min ATP (Endkonzentration 10^{-4} M) dazugegeben. Dies führte zu einer signifikanten Zunahme der Geschwindigkeit innerhalb 1 min auf $94,64 \pm 8,45 \text{ } \mu\text{m/s}$ ($p=0,044$) und hielt sich bis zum Versuchsende auf einem Plateau (Abb. 12).

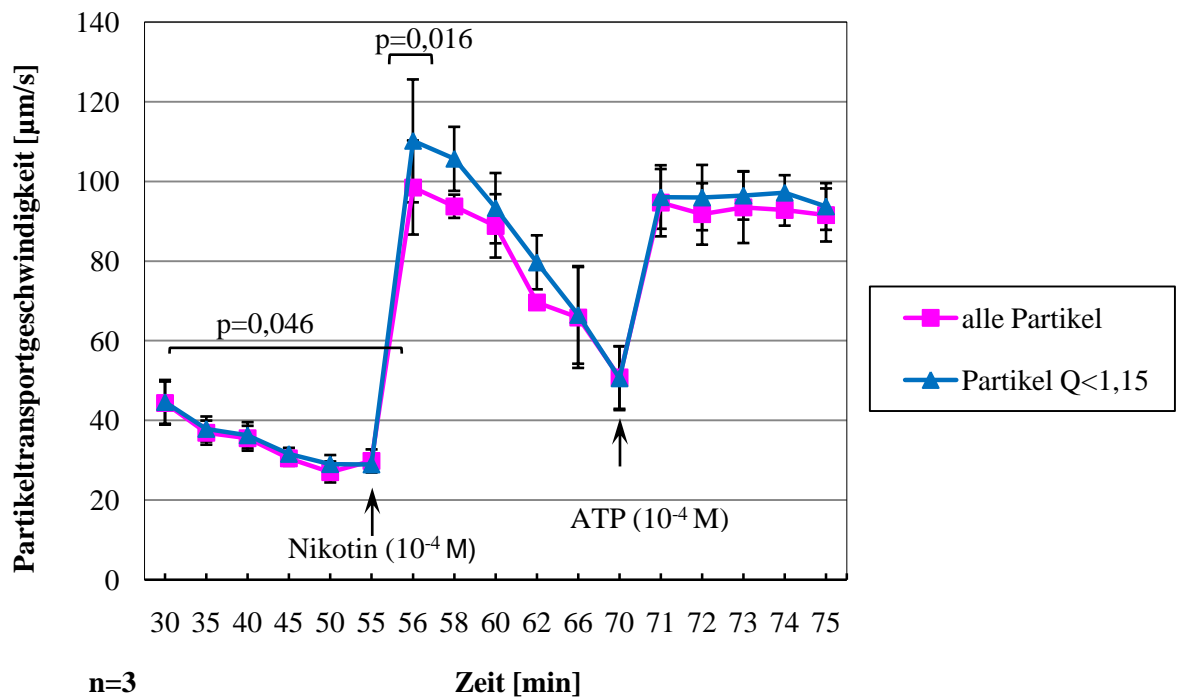


Abb. 12: PTG nach Zugabe von Nikotin gefolgt von ATP bei C57Bl/6 Mäusen. Dargestellt sind die MW der Geschwindigkeitsmessungen mit dazugehörigen Standardfehlern (SEM). Die Kurve mit Vierecksymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel. Die Kurve mit Dreiecksymbolen stellt nur solche Partikel dar, bei denen der zurückgelegte Weg zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$). Die Zugabe von ATP diente zur Überprüfung der Vitalität der Trachea.

3.2.2 PTG nach Zugabe von Nikotin bei nAChR $\alpha 7^{-/-}$ Mäusen

Nach einem signifikanten Abfall der PTG von $50,26 \pm 2,7 \mu\text{m/s}$ auf $27,68 \pm 3,17 \mu\text{m/s}$ ($p \leq 0,001$) über die ersten 25 min nach Versuchsbeginn bewirkte die Zugabe von Nikotin (Endkonzentration 10^{-4} M) eine signifikante Steigerung der PTG. In den nächsten 15 min nach Nikotinzugabe wurde die PTG in Abständen von 2 min gemessen. Bereits in der 56. min konnte eine signifikante Steigerung auf $84,99 \pm 19,82 \mu\text{m/s}$ ($p=0,030$) gemessen werden. In der 58. Minute erreichte die Geschwindigkeit ein Maximum von $91,59 \pm 23,65 \mu\text{m/s}$. Zwischen Nikotin und der ATP Zugabe in der 70. Minute wurde erneut eine signifikante Senkung der PTG auf $43,96 \pm 8,38 \mu\text{m/s}$ festgestellt ($p=0,031$). Nach Zugabe von ATP erreichte die PTG einen maximalen Wert von $91,68 \pm 14,06 \mu\text{m/s}$ und in den nächsten 5 min bis zum Versuchsende stellte sich ein Plateau ein (Abb. 13).

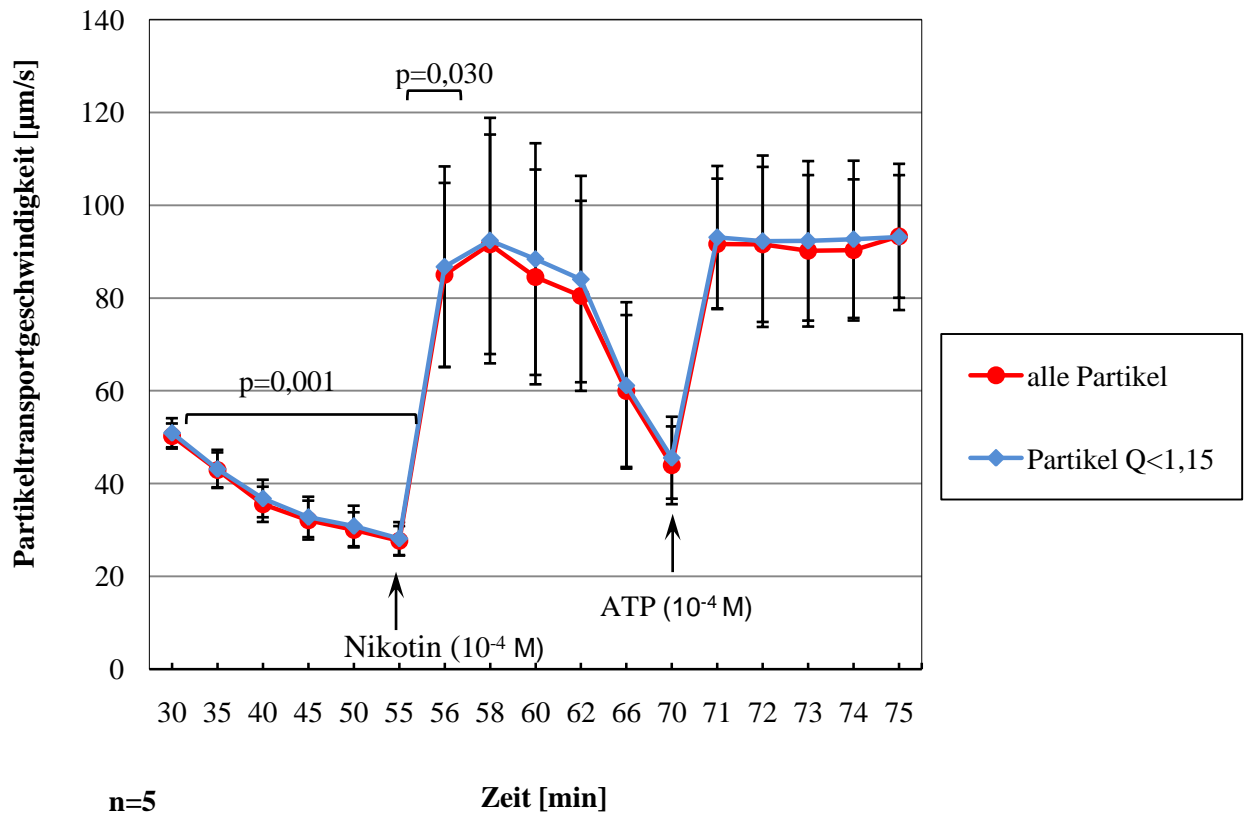


Abb. 13: PTG nach Zugabe von Nikotin gefolgt von ATP bei $\alpha 7$ nAChR^{-/-} Mäusen. Dargestellt sind die MW der Geschwindigkeitsmessungen mit dazugehörigen SEM. Die Kurve mit Kreissymbolen zeigt die Werte aller transportierten Partikel. Die Kurve mit Rautensymbolen stellt nur solche Partikel dar, bei denen der zurückgelegte Weg zwischen einem Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% vom direkten Weg abweicht ($Q < 1,15$). Die Zugabe von ATP diente zur Überprüfung der Vitalität.

3.2.3 Vergleich der PTG nach Nikotin- und ATP-Zugabe bei nAChR α_7 ^{-/-} und C57Bl/6 WT Mäusen

Startgeschwindigkeit

Zum Startpunkt der Versuche betrug die Geschwindigkeit der Partikel bei den Bl6 Mäusen $44,33 \pm 5,41 \mu\text{m/s}$. Dies war nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu der Startgeschwindigkeit der nAChR α_7 ^{-/-} Mäuse.

PTG nach 25 min Versuchsdauer

Nach 25 min ergab die PTG bei den C57Bl/6 WT Mäusen einen Wert von $27,68 \pm 3,17 \mu\text{m/s}$. Zu diesem Zeitpunkt lag der Wert der PTG bei den nAChR α_7 ^{-/-} Mäusen bei $29,81 \pm 2,90 \mu\text{m/s}$. Bei der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den KO-Mäusen und dem entsprechenden WT-Stamm gezeigt werden.

PTG nach Nikotinzugabe

Nach der Nikotinzugabe lag der MW in der 56. min bei den C57Bl/6 WT-Mäusen bei $98,45 \pm 11,81 \mu\text{m/s}$. Mit einem Wert von $84,99 \pm 19,82 \mu\text{m/s}$ zeigten die nAChR α_7 ^{-/-} Mäusen zu dem gleichen Zeitpunkt keinen signifikanten Unterschied zur PTG ihres entsprechenden WT-Stammes. Auch in den nächsten 15 min bis zur ATP-Zugabe zeigten die nAChR α_7 ^{-/-} Mäuse keinen signifikanten Unterschied in der PTG zu dem entsprechenden WT-Stamm.

PTG nach ATP-Zugabe

Die Zugabe von ATP in 70 min zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden getesteten Mäusestämmen. In der 71. Minute erreichte die PTG der WT-Mäuse einen MW von $94,64 \pm 8,45 \mu\text{m/s}$ und bei den nAChR α_7 ^{-/-} Mäusen von $91,68 \pm 14,6 \mu\text{m/s}$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass während des gesamten Versuchs die PTG der beiden getesteten Mäusestämme keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (Abb. 14).

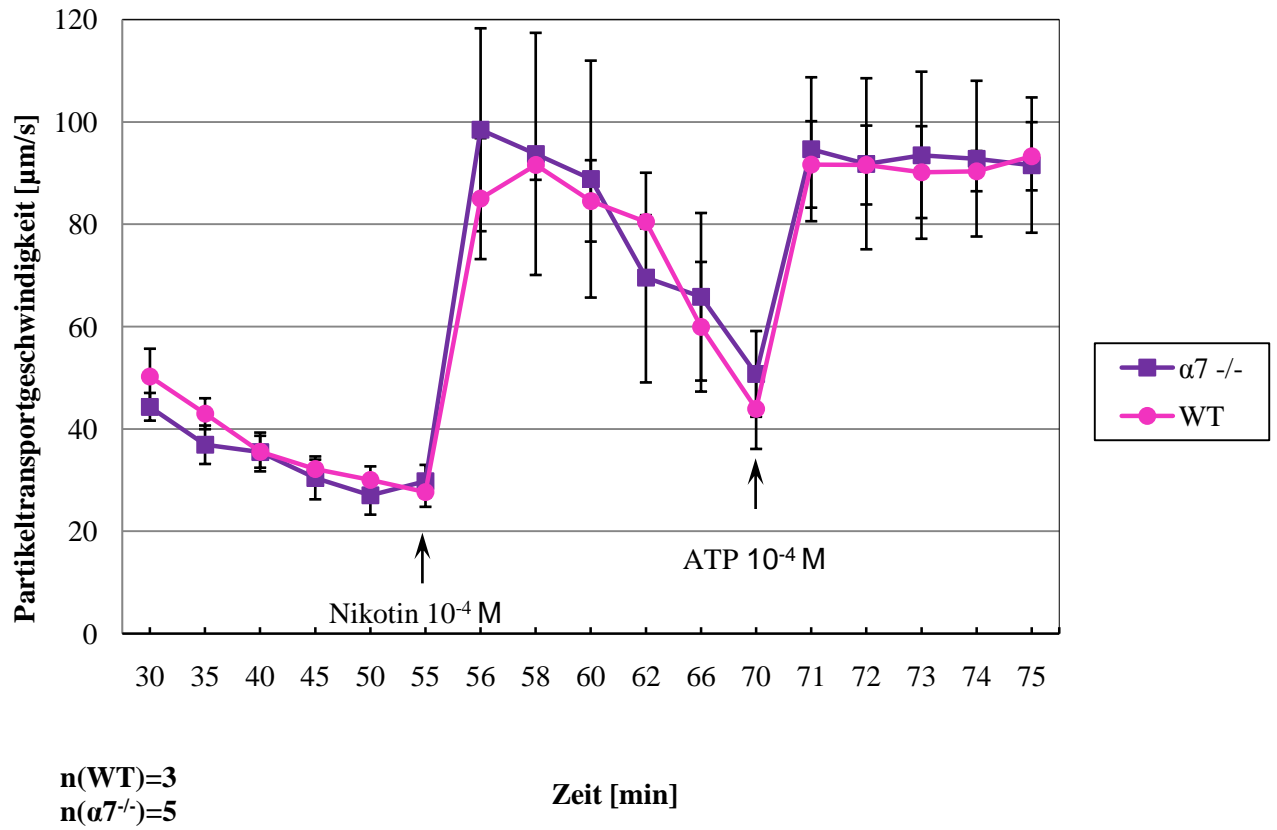


Abb. 14: Vergleichende Darstellung der PTG des getesteten KO-Stammes und des korrespondierenden WT-Stammes nach exogener Nikotin- und ATP-Zugabe. Dargestellt sind die MW mit SEM jedes Stammes. Die Kurve mit den Vierecksymbolen stellt die Werte der KO-Mäusen dar und die Kurve mit den Kreissymbolen die Werte des korrespondierenden WT-Stammes.

3.3 Auswirkung der Gabe von Nikotinrezeptorantagonisten auf die PTG bei C57Bl/6 Mäusen.

3.3.1 Mecamylamin

Zu Versuchsbeginn in der 30. min betrug die PTG $52,08 \pm 2,27 \mu\text{m/s}$. In den nächsten 25 min bis zur Nikotin-Zugabe kam es zu einem signifikanten Abfall der Geschwindigkeit auf $25,08 \pm 9,3 \mu\text{m/s}$. Da in den nachfolgenden Versuchen der Einsatz von in Wasser gelösten Nikotinrezeptorantagonisten vorgesehen war, wurde in der 56. min Wasser dazugegeben. Dies diente als Kontrolle, um zu überprüfen, ob der Pipettivorgang als solcher einen Einfluss auf die PTG hat. Diese Wasser-Zugabe bewirkte keine signifikante Steigerung der Geschwindigkeit ($p=0,172$). In der 60. min erfolgte die Nikotin-Zugabe (Endkonzentration 10^{-4} M), was eine signifikante Steigerung der MW von $25,08 \pm 9,3 \mu\text{m/s}$ auf $54,58 \pm 7,3 \mu\text{m/s}$ (217,6%) erbrachte. In den nächsten 15 min bis zur ATP-Zugabe kam es zu einem signifikanten Abfall der PTG bis auf $24,93 \pm 2,98 \mu\text{m/s}$. Zur Überprüfung der Vitalität der Trachea wurde ATP in einer Endkonzentration von 10^{-4} M dazugegeben. Dies führte zu einem erneuten signifikanten Anstieg der PTG auf $67,95 \pm 7,10 \mu\text{m/s}$.

In der Versuchsreihe mit MEC fiel die Geschwindigkeit der Partikel von Versuchsbeginn bis zur 56. min von $63,60 \pm 8,61 \mu\text{m/s}$ signifikant auf $29,75 \pm 6,40 \mu\text{m/s}$. Die Zugabe von MEC (Endkonzentration 10^{-4} M) in der 56. min hatte alleine keinen Einfluss auf die PTG. Bei der darauf folgenden Zugabe von Nikotin (Endkonzentration 10^{-4} M) erfolgte aber nach vorheriger MEC-Gabe keine Stimulation der Geschwindigkeit. Die Zugabe von ATP (Endkonzentration 10^{-4} M) ergab eine signifikante Erhöhung der PTG von $23,45 \pm 2,30 \mu\text{m/s}$ auf $67,85 \pm 9,28 \mu\text{m/s}$, was ein Beweis für die Vitalität der Trachea war (Abb. 15).

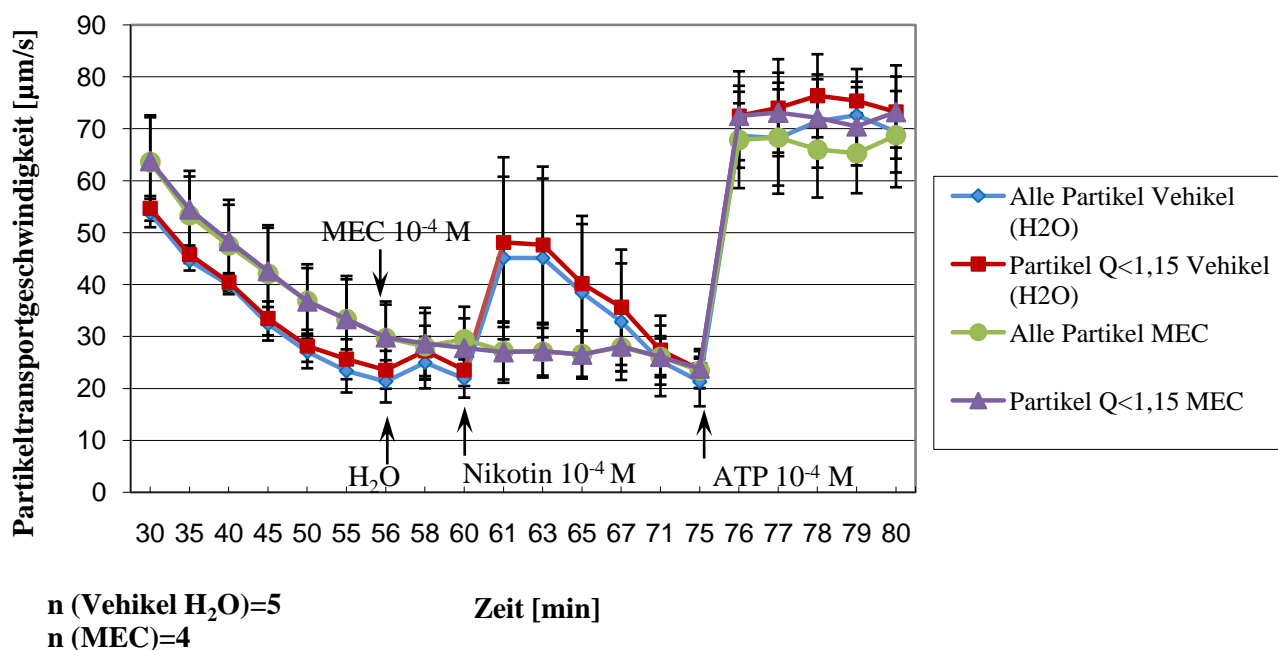


Abb. 15: Vergleichende Darstellung der PTG nach Zugabe von MEC, Nikotin und ATP und die entsprechenden Kontrollen bei C57/Bl6 Mäusen. Nach Zugabe von MEC (Endkonzentration 10^{-4} M) bewirkte Nikotin keine Stimulation der PTG mehr. Die Zugabe von H₂O hatte keinen Einfluss auf die PTG.

3.3.2 α -Conotoxin MII

Zu Beginn in der 30. min zeigte die PTG einen Wert von $57,80 \pm 3,82 \mu\text{m/s}$. In den nächsten 25 min bis zur Nikotin-Zugabe kam es zu einem signifikanten Abfall der PTG auf $28,54 \pm 4,91 \mu\text{m/s}$. In der 56. min wurde Wasser dazugegeben. Im weiteren Versuchsverlauf 2 min nach Wasser-Zugabe in der 58. min erfolgte eine nicht signifikante Steigerung der Geschwindigkeit ($p=0,172$), die in der 60. min wieder sank. In der 60. min wurde Nikotin in einer Endkonzentration von 10^{-4} M zugegeben. Dies führte zu einer signifikanten Steigerung der MW von $27,10 \pm 5,27 \mu\text{m/s}$ auf $57,49 \pm 12,55 \mu\text{m/s}$ ($p=0,03$). In der 63. min erreichte die PTG die Maximalgeschwindigkeit von $60,41 \pm 13,67 \mu\text{m/s}$. In den nächsten 15 min bis zur ATP-Zugabe kam es zu einem signifikanten Abfall der PTG bis auf $31,87 \pm 8,02 \mu\text{m/s}$. Die anschließende Zugabe von ATP führte zu einem erneuten signifikanten Anstieg der PTG auf $71,28 \pm 4,29 \mu\text{m/s}$, was die Vitalität der Trachea bewies.

Auch in der Versuchsreihe mit α -CTX MII (Endkonzentration 10^{-3} M) zeigte sich 30 min nach Versuchsbeginn eine signifikante Abnahme der PTG von einem Startwert $58,85 \pm 4,77 \mu\text{m/s}$ auf $40,73 \pm 5,30 \mu\text{m/s}$. Die Zugabe von α -CTX MII (Endkonzentration 10^{-3} M) in der 55. min hatte keinen Einfluss. Die nachfolgende Zugabe von Nikotin führte innerhalb 1 min zu einem signifikanten Anstieg auf $82,51 \pm 11,27 \mu\text{m/s}$ ($p=0,003$). Hierbei bestand kein signifikanter Unterschied zur Versuchsgruppe mit Vehikelzugabe (H_2O). Nach 15 min Messdauer und einer signifikanten Abnahme der Geschwindigkeit bis auf $35,01 \pm 3,72 \mu\text{m/s}$ erfolgte die Überprüfung der Vitalität der Trachea durch ATP-Zugabe. Dies konnte analog zu den anderen Versuchen die Geschwindigkeit signifikant bis auf $70,72 \pm 10,67 \mu\text{m/s}$ ($p=0,016$) steigern (Abb. 16).

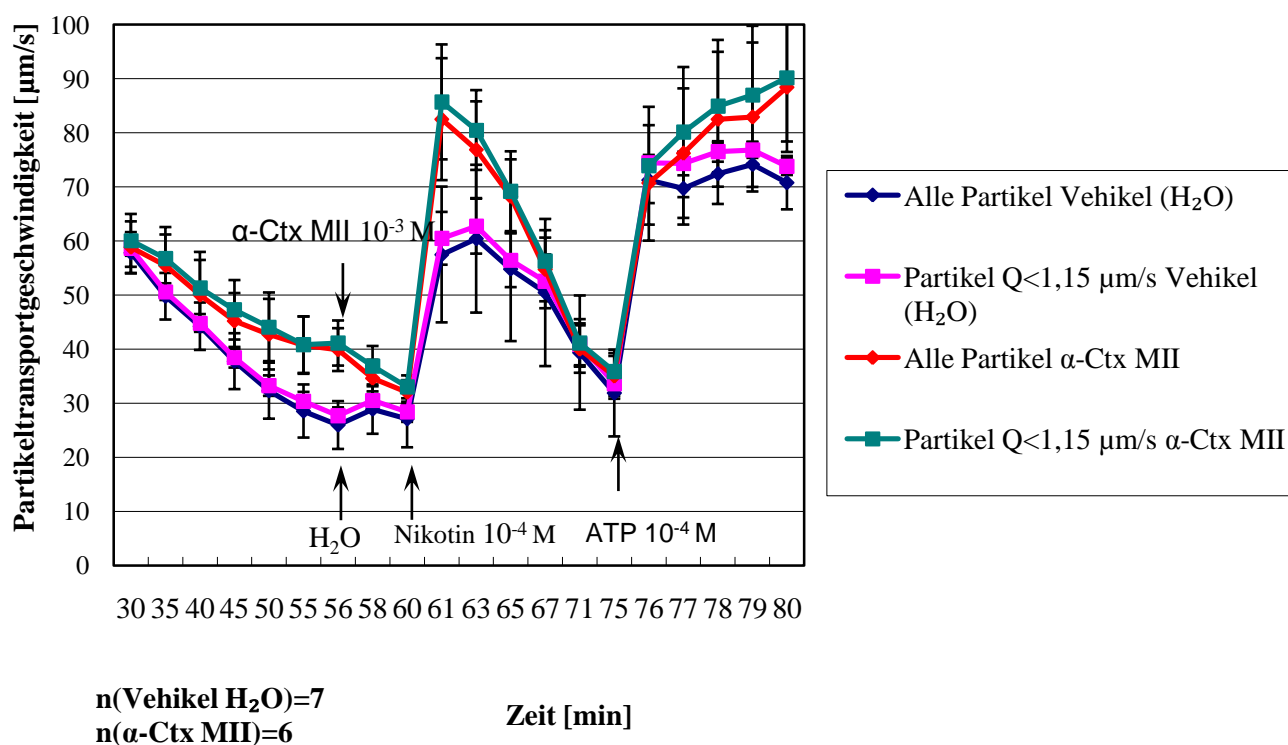


Abb. 16: Vergleichende Darstellung der PTG nach Zugabe von α -CTX MII, Nikotin und ATP und die entsprechenden Kontrollen mit H_2O bei C57/Bl6 Mäusen. Sowohl die α -CTX MII-Zugabe als auch die Kontrollen mit H_2O hatten keinen Einfluss auf die nachfolgende Stimulation mit Nikotin.

4 Diskussion

4.1 Messung des ziliären Partikeltransports mittels einer etablierten Methode

Der Einfluss verschiedener Faktoren (chemische, mechanische und elektrische), die den effektiven ziliären Partikeltransport in der Trachea modulieren, wurde bereits in vielen Studien behandelt. In ihrer Arbeit von 1996 beschrieben Wanner und Mitarbeiter neben der ZSF auch einen physiologisch ablaufenden Zilienschlag und das koordinative Zusammenspiel innerhalb einer zilientragenden Zelle und zwischen den benachbarten zilientragenden Zellen als wichtige Parameter (Wanner et al., 1996).

Zur Ermittlung des ziliären Partikeltransports wurde in der vorliegenden Arbeit unter Berücksichtigung dieser Einflussfaktoren ein von Klein und Mitarbeiter (2008) neu etabliertes videomikroskopisches System verwendet. Bei diesem Messsystem wurde der Partikeltransport in der explantierten und geöffneten Trachea durch ein Immersionsobjektiv bei einer während des gesamten Versuchs konstanten Temperatur von 30°C des Mediums (Hepes-Ringer-Lösung) aufgenommen und analysiert.

In vielen der früheren Veröffentlichungen wurde die tragende Rolle des Zusammenspiels zwischen Zilien und Mukusschicht beschrieben, damit es überhaupt zu einem effektiven Partikeltransport kommen kann (Sadè et al., 1970; Wanner et al., 1996). Die Funktion der Zilien konnte in den bisher verwendeten Messsystemen nicht getrennt von der darauf liegenden Mukusschicht betrachtet werden (Connolly et al., 1978). Über die Wichtigkeit der Mukusschicht und den Zusammenhang zwischen Mukus und Partikeltransport schreiben 1988 auch Sleigh und Mitarbeiter. Sie stellen fest, dass der Ersatz des Mukus durch eine Ringer-Lösung eine Abnahme des Partikeltransports bewirken kann. Im Gegensatz dazu bleibt die ZSF unverändert (Sleigh et al., 1988).

Dass die ZSF einen Einfluss auf die Partikel- sowie Strömungsgeschwindigkeit hat, wurde am hier verwendeten Modell belegt. Hussong und Mitarbeiter (2008) führten die ersten μ PIV/PTV (*micro Particle Image Velocimetry*) Messungen an explantierten Mäusetracheen durch. Sie konnten simultane Messungen der Strömungsgeschwindigkeit und des Partikeltransports durchführen. Der Partikeltransport in der Mastrachea wies signifikante Unterschiede im Vergleich zu den zilien-induzierten

Strömungen auf, die auf der Epitheloberfläche in Einzelfällen bis zu 90° Abweichungen zeigten (Hussong et al., 2008). In wandnahen Bereichen wies der Fluidtransport Richtungsänderungen auf, bedingt durch die topographischen Eigenschaften der Epitheloberfläche und beeinflusst durch den Zilienschlag. Größere Gruppierungen der zilientragenden Zellen bewirkten eine deutliche Zunahme der zeitgemittelten, räumlich begrenzten Geschwindigkeit. Generell zeigten die Versuche einen durch den Zilienschlag hervorgerufenen Flüssigkeitsstrom, der die in der Flüssigkeit sich befindenden Partikel mitnimmt, wobei unmittelbar auf dem Epithel Ablenkungen der Partikel erfolgen können. Mukus ist für diese Vorgänge nicht erforderlich (Hussong et al., 2008).

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Messmethode wurde die Mukusschicht durch ein vorsichtiges Waschen der Trachea mit Hepes-Ringer-Lösung entfernt. Während der gesamten Versuchsdauer befand sich die Trachea in Hepes-Ringer-Lösung, es erfolgte somit auch kein Aufbau einer Sekretschicht während der Messungen. Die PTG-Messungen entlang der gesamten Trachea sind daher unabhängig von eventuell parallel ablaufenden Änderungen des Trachealsekrets (Klein et al., 2008).

4.2 Nikotin vermittelt über nAChR eine stimulierende Wirkung auf PTG

ACh spielt eine wichtige regulative Rolle bei der Auslösung und dem Erhalt der Zilienbewegung. Erste Beweise dafür wurden in Experimenten an Protozoen (*Paramecium caudatus*) und der Kiemenplatte der Seemuschel, *Mytilis edulis*, geliefert. Dabei konnte gezeigt werden, dass ACh und Physostigmin, ein Inhibitor des ACh-abbauenden Enzyms AChE, die Zilienbewegung aktivieren können (Bülbring et al., 1953).

Bei Versuchen am Ösophagus des Frosches sowie an der Trachea von Kaninchen und Menschen konnten erneut Kordik und Mitarbeiter (1952) sowie Sastry und Sadavongvivad (1978) eine stimulierende Wirkung von ACh nachweisen. Die anschließende Zugabe von Atropin, einem Antagonisten an mAChR Rezeptoren, führte zu einer Reduktion der Zilienbewegung. Bei Versuchen an kultivierten, zilientragenden Zellen der Schafstrachea führte die ACh-Zugabe zu einer Erhöhung der ZSF. Atropin-Zugabe hemmte die Zilienaktivität (Salathe et al., 1997). Schon 1905 berichtete John Langley

über das Pflanzenalkaloid Nikotin, das gleiche Wirkung auf die Nervenendigungen des autonomen Nervensystems hat wie die rezeptor-vermittelte Antwort durch ACh (Langley, 1905).

Nikotin kann alle nAChR aktivieren, mit Ausnahme der Rezeptoren, die aus den $\alpha 9$ - und $\alpha 9\alpha 10$ Untereinheiten aufgebaut sind, wo Nikotin eine hemmende Wirkung hat (Wonnacott, 2007). Über die widersprüchliche Natur des Nikotins schrieben Gahring und Rogers (2006). Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften wird Nikotin, einmal gebunden an einem nAChR, nicht so schnell abgebaut und entfernt wie die natürlichen Liganden ACh und Cholin und kann über längeren Zeiten in verschiedenen Geweben akkumulieren (Gahring und Rogers, 2006). Die Akkumulation von Nikotin und die lang anhaltende Bindung am Rezeptor können eine dauerhafte Desensibilisierung oder die vollständige Blockierung des Rezeptors verursachen (Hogg et al., 2003), abhängig von der Dauer der Exposition, Konzentration und Expression der einzelnen Rezeptor-untereinheiten (Gahring und Rogers, 2006).

Kordik und Mitarbeiter zeigten bei der Kaninchentrachea, dass im Gegensatz zu der stimulierenden Wirkung von ACh, Nikotin keinen Einfluss auf die Bewegung der Zilien bewirkt (Kordik et al., 1952). Andererseits konnte die Arbeitsgruppe von Hahn eine stimulierende Wirkung von Nikotin auf die ZSF bei der Trachea des Frettchens ohne eine Steigerung der Mukussekretion nachweisen (Hahn et al., 1992).

In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit den Versuchen von Hahn et al. (1992) eine Nikotin-induzierte PTG-Steigerung in allen der getesteten Mäusestämme nachgewiesen werden.

Entgegen der bisher vertretenen Meinung, dass die Effekte von Nikotin auf Nervenfasern ausschließlich durch nAChR vermittelt werden, zeigte die Arbeitsgruppe von Talavera et al., dass Nikotin in sensorische Neuronen in Abhängigkeit von Dosis und Pharmakokinetik auch über TRPA1-Ionenkanäle (transient receptor potential Ankyrin 1) wirken kann (Talavera et al., 2009). Die TRPA1-Kanäle sind nicht-selektive Ionenkanäle, die von sensorischen Neuronen der Haut, des Respirations- und Gastrointestinaltraktes exprimiert werden. Sie werden durch potenziell schädigende Substanzen in der Luft oder Nahrungskomponenten aktiviert, verursachen depolarisierenden Membranströme und lösen Aktionspotenziale aus (Jiang et al., 2011). Nikotin kann sich bei niedrigeren Konzentrationen aktivierend und bei höheren Konzentrationen inhibierend auf die TRPA1-Kanäle auswirken und kann somit eine

bimodale Wirkung haben. Außerdem vermitteln die TRPA1-Ionenkanäle die Nikotin-induzierte Konstriktion der Atemwege in der Maus (Talavera et al., 2009).

Es ist daher zu prüfen, ob die Nikotin-stimulierende Wirkung auf die PTG in der Mastrachea über die TRPA1-Kanäle oder nAChR erfolgt.

In dieser Arbeit wurden Versuchen mit einem generellen NACHR-Antagonisten MEC, an C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. MEC ist ein nicht kompetitiver Antagonist oder negativer allosterischer Modulator für alle neuronalen nAChR. Er kann die Bindung eines Agonisten an den nAChR hemmen, indem er an eine andere (allosterische) Bindungsstelle als der Agonist an den Rezeptor bindet. Diese allosterischen Stellen können sich im Kanallumen des nAChR befinden und einen vollständigen Verschluss des Rezeptorkanals verursachen. Dabei kann die inhibitorische Wirkung nicht durch eine Steigerung der Agonistenkonzentration überwunden werden, wie es der Fall bei den kompetitiven Antagonisten ist (Wonnacott und Barik, 2007).

In den 50er Jahren wurde MEC (Inversine ®) als erster Ganglienblocker bei der Therapie von hohem Blutdruck eingesetzt (Shytle et al., 2002). Im Magen-Darm-Trakt wird MEC fast vollständig absorbiert, kann leicht die Blut-Hirn-Schranke passieren und wirkt dort als Antagonist an den nAChR (Martin et al., 1989).

Die Effekte von MEC basieren auf der Hemmung der Impulsübertragung in den sympathischen Ganglien auf Grund der Blockade der nAChR. Die Blockierung der Ganglien verursacht eine Vasodilatation mit Anstieg des peripheren Blutflusses und somit Blutdrucksenkung (Shytle et al., 2002). Nach der Zugabe von Mecamylamin in einer Endkonzentration von 10^{-4} M wurden die Nikotineffekte auf die PTG vollständig gehemmt. Dies zeigte eindeutig, dass die durch Zugabe von Nikotin bedingte PTG-Steigerung über die nAChR erfolgt.

4.3 Eingrenzung der an der PTG–Steigerung beteiligten nAChR

Der Mangel an spezifischen Agonisten und Antagonisten mit hoher Selektivität für die einzelnen Untereinheiten bedingt Schwierigkeiten bei der Identifikation der für einen Effekt verantwortlichen nAChR (Albuquerque et al., 1996).

Von großem Interesse sind die Homopentamere, aufgebaut aus der $\alpha 7$ -Untereinheit des nAChR, die laut Papke und Mitarbeitern (1993) eine Rolle bei der Vermittlung der hormonellen Wirkung von ACh in nicht-neuronalen Gewebe spielen. Ihnen werden sowohl ionotrope als auch metabotrope Eigenschaften zugeschrieben (Conti-Fine et al.,

2000). Diese Rezeptoren können durch Cholin, ein Spaltprodukt von ACh, aktiviert werden. Somit ist die Signalübertragung durch die $\alpha 7$ nAChR nicht auf kurzen Strecke begrenzt (Conti-Fine et al., 2000). Außerdem zeigen die $\alpha 7$ nAChR eine hohe Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen (Seguela et al., 1993; Albuquerque et al., 1995) und können somit die intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration verändern, was eine Modulation metabolischer Prozesse als Folge hat (Conti-Fine et al., 2000).

Die Wichtigkeit der $\alpha 7$ -Untereinheit enthaltenden Rezeptoren wurde in diversen wissenschaftlichen Arbeiten gezeigt. Sie werden im kleinzellulären Lungenkrebs und in Zelllinien von diesem Tumor exprimiert (China et al., 1992; Quick et al., 1994). Codignola und Mitarbeiter (1996) vermuten eine modulierende Funktion dieser Rezeptoren auf das Tumorzellwachstum, da die spezifischen $\alpha 7$ -Antagonisten α -BTX und α -CTX Imperialis I inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Tumorzellen haben. $\alpha 7$ nAChR werden auch von den Keratinozyten exprimiert (Grando et al., 1995). Da die $\alpha 7$ nAChR eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der proliferativen Nikotineffekte in Lungenkrebszellen spielen (Paleari et al., 2008), werden sie als ein neues, wichtiges Zielmolekül bei der Lungenkrebstherapie angesehen (Lee et al., 2011). Eine signifikante Steigerung der $\alpha 7$ nAChR-Expression und dadurch bedingte Änderung der fetalen Lunge und Lungenfunktion bei neugeborenen Rhesus-Affen konnten auch Sekhon und Mitarbeiter (1999) bei einer pränatalen Nikotinexposition nachweisen.

In diversen wissenschaftlichen Arbeiten wurde die Fähigkeit der $\alpha 7$ -Untereinheit der nAChR, heteromere Rezeptoren zu bilden, besprochen. Cuevas und Berg (1998) und Cuevas und Mitarbeiter (2000) beschreiben einen solchen Rezeptor in der Ratte im Ganglion cardiacum und Ganglion cervicale superius. Ähnlich vermuten Yu und Role (1998) das Vorkommen von $\alpha 7$ heteromeren nAChRs in sympathischen Neuronen von Hühnern. Zum ersten Mal konnten 2002 Khiroug und Mitarbeiter eine mögliche Koexpression der $\alpha 7$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten in der Ratte nachweisen und somit die Bildung von $\alpha 7$ -Heteromeren, die im Vergleich zu den $\alpha 7$ -Homopentameren veränderten biophysiological und pharmakologische Eigenschaften besitzen. Diese Heteromeren unterscheiden sich deutlich in der langsamen Desensibilisierung der Ionenkanäle, die sie bilden, und in der geänderten Sensitivität gegenüber Agonisten (Khiroug et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden an Mäusen, die gendefizient für die $\alpha 7$ -Untereinheit des nAChR sind, und deren korrespondierendem WT-Stamm Messungen der PTG

durchgeführt. Nach Nikotin-Zugabe zeigten beiden Tiergruppen einen signifikanten Anstieg der PTG und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen beobachtet werden. Dies beweist, dass die $\alpha 7$ -Untereinheit nicht für die durch Nikotin-induzierte Steigerung der PTG in der Mastrachea verantwortlich ist.

4.4 α -Conotoxin MII hat keinen Einfluss auf die durch Nikotin erhöhte PTG

α -Conotoxine sind kurze Peptide (ca. 12-25 AS), die vier Cystein-Reste in 2 Disulfidbindungen enthalten. Sie werden aus dem Gift der Meeresschnecken der Gattung *Conus* isoliert.

1996 konnten Cartier und Mitarbeiter zum ersten Mal α -CTX MII, ein Peptid mit 16 AS der Schneckengattung *Conus magus*, an auf von *Xenopus leavis* Oozyten exprimierten nAChR charakterisieren (Cartier et al., 1996).

Die Wirkungsweise von α -CTX MII ist sehr kompliziert. Es wird nach dem römischen Gott mit zwei Gesichtern „Janus-Ligand“ genannt. Jensen beschreibt einen Zweistufen „dock und lock“-Mechanismus. Primär erfolgt die Anbindung an die komplementäre β -Untereinheit mit nachfolgender Bindung und Stabilisierung der α -Untereinheit (Jensen, 2005). Das Peptid blockiert $\alpha 3 \beta 2$ nAChR mit einem IC_{50} -Wert von 0,5 nM. Eine ähnlich hohe Affinität für nAChR, die $\alpha 6$ -Untereinheiten enthalten, wurde von Kuryatov und Mitarbeiter (2002) nachgewiesen.

Die $\alpha 3$ -Untereinheit wird grundsätzlich im respiratorischen Epithel exprimiert und mit Karzinomentstehung in Verbindung gebracht (West et al., 2003; Song et al., 2008). Die durch Nikotin hervorgerufene Steigerung der PTS wurde durch α -CTX MII nicht gehemmt. Somit wird diese Wirkung nicht über $\alpha 3 \beta 2$ nAChR oder $\alpha 6$ -enthaltende nAChR vermittelt.

Bei allen durchgeführten Versuchen führte die externe Stimulation mit ATP (Endkonzentration 10^{-4} M) zu einer signifikanten Steigerung der PTG. Dies bestätigt die Ergebnisse von Hayashi und Mitarbeiter, dass in den zilienträgenden Zellen der Mastrachea die externe Zugabe von ATP die Erhöhung der ZSF zu Folge hat (Hayashi et al., 2005). In allen getesteten Mäusestämmen diente der Einsatz von ATP hauptsächlich zur Überprüfung der Vitalität der jeweiligen Trachea. Die Steigerung der PTS bestätigte zusätzlich die ATP stimulierende Wirkung.

4.5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nikotin eine stimulierende Wirkung auf die PTG in der Mastrachea hat. Durch den Einsatz von MEC, einem generellen nAChR-Antagonisten, bei C57/Bl6 Mäusen konnte die Nikotin-bedingte Stimulation der PTG vollständig inhibiert werden. Dies zeigt, dass die Wirkung über einen nAChR vermittelt wird.

Im Zusammenhang mit der Entstehung von Bronchialkarzinomen sind insbesondere die nAChR Untereinheiten $\alpha 7$ und $\alpha 3$ von großer Bedeutung. Durch die Verwendung eines $\alpha 7$ nAChR gendefizienten Mausstamms und eines spezifischen $\alpha 3$ nAChR Antagonisten konnte hier allerdings gezeigt werden, dass diese beiden Rezeptoren nicht für die Nikotin-induzierte Steigerung der PTG verantwortlich sind.

5 Zusammenfassung

Bei der Exposition gegenüber Zigarettenrauch kommt es zu wichtigen biologischen Veränderungen im respiratorischen Epithel. Durch Tabakkonsum erfolgt eine Reduktion der mukoziliären Clearance und zu einer gestörten Koordination des Zilienschlags, somit kommt es zur Abschwächung des Schutzmechanismus gegenüber eingeatmeten Partikeln und Pathogenen. Unklar ist, ob diese Wirkung auf Nikotin einen wichtigen chemischen und pharmakologisch aktiven Bestandteil des Tabakrauchs, zurückzuführen ist. Nikotin wirkt meist über nikotinische Azetylcholinrezeptoren (nAChR), welches Liganden-gesteuerte Kationenkanäle sind.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob Nikotin die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) in der Mastrachea beeinflusst, und falls ja, ob dies über nAChR, insbesondere den $\alpha 7$ -Subtyp erfolgt. Angewendet wurde eine von Klein und Mitarbeiter in 2008 etablierte Messmethode, mit der Messungen der PTG entlang der gesamten Länge der Trachea unabhängig von der Anwesenheit einer Mukusschicht durchgeführt werden können.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Nikotin (Endkonzentration 10^{-4} M) eine signifikante Steigerung der PTG bewirkt, die bei wiederholter Gabe schnell desensitisiert. Diese Nikotin-bedingte PTG-Steigerung wird über nAChR vermittelt, da sie durch den generellen nAChR Antagonisten Mecamylamin aufgehoben wird. Bei der Anwendung von α -Conotoxin MII, einem spezifischen $\alpha 3$ nAChR Antagonisten, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der durch Nikotin indizierten Antwort gegenüber den Kontrollen. In den Tracheen von $\alpha 7$ nAChR gendefizienten Mäusen zeigte sich in der Nikotinantwort ebenfalls kein signifikanter Unterschied zum korrespondierenden Wildtypstamm.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Nikotin eine stimulierende Wirkung auf die PTG in der Mastrachea hat, im Gegensatz zu den bekannten hemmenden Wirkungen des Gesamtgemisches Zigarettenrauch. Im Zusammenhang mit der Entstehung von Bronchialkarzinomen sind insbesondere die nAChR Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 7$ von Bedeutung, diese sind jedoch nicht für die nikotininduzierte Steigerung der PTG verantwortlich.

6 Summery

Exposure to cigarette smoke evokes important biological reactions in the respiratory epithelium. Cigarette smoking causes attenuation of mucociliary clearance and to a disturbed coordination of ciliary beat, thereby leading to impairment of protective mechanisms against inhaled particles and pathogens. It is currently unknown whether these effects are caused by nicotine, an important chemical and pharmacologically active compound of cigarette smoke. In general, nicotine acts via nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) which are ligand-gated cation channels.

This study was aimed to investigate whether nicotine has an impact on particle transport speed (PTS) in the murine trachea, and if yes, whether this is mediated via nAChR, in particular those of the $\alpha 7$ subtype. This was addressed by using a technique established by Klein et al. in 2008 which allows quantitative assessment of PTS along the entire length of the trachea independent from the presence of a mucus layer.

The present data show that nicotine (Final concentration 10^{-4} M) causes a significant increase in PTS which quickly desensitizes upon repeated challenge. This nicotine induced PTS increase is mediated via nAChR since it is sensitive to the general nicotinic receptor antagonist, mecamylamine. α -Conotoxin MII, a specific $\alpha 3$ nAChR antagonist, has no impact on nicotine induced PTS increase. Tracheas of nAChR $\alpha 7$ gene-deficient mice responded in the same manner as those of corresponding wild type mice.

Collectively, these data show that nicotine has a stimulatory effect upon PTS in the mouse trachea, in contrast to the known inhibitory effect of the mixed compound tobacco smoke. In the context of the development of bronchial carcinoma, nAChR subunits $\alpha 3$ and $\alpha 7$ are particularly relevant. These, however, are not responsible for nicotine induced stimulation of PTS in the control group. This finding reveals that α -CTX MII has no influence on the cilia-driven increase of PTS.

In view of the importance of non neuronal ACh and the role of nAChR in the pathogenesis of COPD and lung cancer it should be furthermore clarified which nAChR subtypes are responsible for the nicotine induced increase of the PTS and which specific antagonist are able to influence them.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
α -BTX	Alpha-Bungarotoxin
α -CTXMII	Alpha-Conotoxin MII
ACh	Azetylcholin
AChE	Azetylcholinesterase
Acetyl-CoA	Azetyl-Koenzym A
Aqua dest	Aqua destilata
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BChE	Butyrylcholinesterase
CarAT	Carnithinazetyltransferase
ChAT	Cholinazetyltransferase
CHT1	Cholintransporter 1
COOH-terminale Domäne	Carboxy-terminale Domäne
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
d	zurückgelegter Weg
D _A	ideale Distanz
D _B	akkumulierte Distanz
d.h.	das heißt
Dh β E	Dihydro- β -Erythroidine
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
GABA	γ -Aminobuttersäure
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
5-HT	5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin)
KO	Knock-out
Ktr	Kontrollgruppe
M	Molar
MEC	Mecamylamin
M. trachealis	Musculus trachealis
μ PIV	micro particle imaging velocimetry
MD	Medianwert

Abkürzungsverzeichnis

MW	Mittelwert
mAChR	muskarinischer Azetylcholinrezeptor
nAChR	nikotinischer Azetylcholinrezeptor
nAChR $\alpha 7^{-/-}$	nikotinischer Rezeptor $\alpha 7$ Knock out
NH ₂ -terminale Domäne	Amino-terminale Domäne
OCT	organic cation transporter
PTG	Partikeltransportgeschwindigkeit
PTS	particle transport speed
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
t	Zeit
Tab	Tabelle
TRPA1	transient receptor potential A1
v	Partikelgeschwindigkeit
VAChT	vesikulärer Azetylcholintransporter
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Darstellung der Messapparatur
Abbildung 2	Versuchsprotokoll zur Überprüfung der Desensitisierung der nAChR bei Nikotinzugabe an C57/Bl6 Mäusen
Abbildung 3	Versuchsprotokoll zur Messung der PTG nach Zugabe von Nikotin und ATP
Abbildung 4	Versuchsprotokoll zur Messung der PTG nach Zugabe von α -CTX MII und Nikotin
Abbildung 5a	Graphische Darstellung der Distanz zum Ausgangspunkt D_A (ideale Distanz)
Abbildung 5b	Graphische Darstellung der akkumulierten Distanz D_B
Abbildung 5c	Graphische Darstellung der Geschwindigkeit v
Abbildung 6	Darstellung der möglichen Wegstrecken einzelner Partikel, die als Auswertkriterium dienen
Abbildung 7	Darstellung der Trachealoberfläche mit Dynabeads und der Schritte der Bildverarbeitung zur Ermittlung der PTG
Abbildung 8	Einfluss von 10^{-7} M Nikotin auf die PTG
Abbildung 9	Einfluss von 10^{-6} M Nikotin auf die PTG
Abbildung 10	Einfluss von 10^{-5} M Nikotin auf die PTG
Abbildung 11	Einfluss von 10^{-4} M Nikotin auf die PTG

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 12** PTG nach Zugabe von Nikotin gefolgt von ATP bei C57Bl/6 Mäusen
- Abbildung 13** PTG nach Zugabe von Nikotin gefolgt von ATP bei nAChR $\alpha_7^{-/-}$ Mäusen
- Abbildung 14** Vergleichende Darstellung der PTG des getesteten KO-Stammes und des korrespondierenden WT-Stammes nach exogener Nikotin- und ATP-Zugabe
- Abbildung 15** Vergleichende Darstellung der PTG nach Zugabe von MEC, Nikotin und ATP und die entsprechenden Kontrollen bei C57Bl/6 Mäusen
- Abbildung 16** Vergleichende Darstellung der PTG nach Zugabe von α -CTX MII Nikotin und ATP der PTG und die entsprechenden Kontrollen mit H₂O bei C57Bl/6 Mäusen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 2 Verwendete Pharmaka

Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte

7 Literaturverzeichnis

Albuquerque EX, Alkondon M, Pereira EF, Castro NG, Schrattenholz A, Barbosa CT, Bonfante-Cabarcas R, Aracava Y, Eisenberg HM, Maelicke A (1996): Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther* 280(3):1117-36

Arias HR (1997): Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Rev* 25: 133-191

Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y (2004): Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 903-909

Bülbring E, Burn JH, Shelley HJ (1953): Acetylcholine and ciliary movement in the gill plates of *Mytilus edulis*. *Proc Roy Soc B* 141: 445-466

Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, Luo S, Baldomero M, Olivera BM, McIntosh JM (1996): A New α -Conotoxin Which Targets $\alpha 3\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Biol Chem* 271 (13): 7522-7528

Codignola A, McIntosh JM, Cattaneo MG, Vicentini LM, Clementi F, Sher E (1996): α -Conotoxin imperialis I inhibits nicotine-evoked hormone release and cell proliferation in human neuroendocrine carcinoma cells. *Neurosci Lett* 206(1): 53-6

Connolly TP, Noujaim AA, Man SF (1978): Simultaneous canine tracheal transport of different particles. *Am Rev Respir Dis* 118(5):965-8

Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, Maus AD (2000): Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol* 393: 279-294

Cuevas J, Berg DK (1998): Mammalian nicotinic receptors with alpha7 subunits that slowly desensitize and rapidly recover from alpha-bungarotoxin blockade. *J Neurosci* 18(24): 10335-44

Cuevas J, Roth AL, Berg DK (2000): Two distinct classes of functional 7-containing nicotinic receptor on rat superior cervical ganglion neurons. *J Physiol* 525 (Pt 3): 735-46

Dale HH (1914): The action of certain ethers of choline and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* 6: 147 -190

D'Angelo A, Franco B (2009): The dynamic cilium in human disease. *Pathogenetics* 2(3):1-15

Dani JA, Bertrand D (2007): Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 699-729

Eley L, Yates LM, Goodship JA (2005): Cilia and disease. *Curr Opin Genet Dev* 15, 308-314

Erjefalt JS, Sundler F, Persson CG (1997): Epithelial barrier formation by airway basal cells. *Thorax* 52: 213-217

Ewins AJ (1914): Acetylcholine a new active principle of ergot. *Biochem J* 8: 44-49

Falk-Vairant J, Correjege P, Eder-Colli L, Salem N, Roulet E, Bloc A, Meuniert F, Lesbatst B, Loctin F, Synguelakis M, Israël M, Dunant Y (1996): Quantal acetylcholine release induced by mediatophore transfection. *Proc Natl Acad Sci* 93: 5203-5207

Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K (2008): Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci* 106: 186-192

Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, Kawashima K (1996): Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res* 44:66–72

Gahring LC, Rogers SW (2005): Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J* 7(4):E885-94

Gheber I, Priel Z (1994): Metachronal activity of cultured mucociliary epithelium under normal and stimulated conditions. *Cell Motil Cytoskeleton* 28: 333-345

Georig M, Ullrich V, Schettler G, Foltis C, Habenicht A (1992): A new role for nicotine: selective inhibition of thromboxane formation by direct interaction with thromboxane synthase in human promyelocytic leukaemia cells differentiating into macrophages. *Clin Investig* 70: 239-243

Gilula NB, Satir P (1972): The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J Cell Biol* 53: 494-509.

González-Sistal A, Reigada D, Puchal R, Gómez de Aranda I, Elias M, Marsal J, Solsona C (2007): Ionic dependence of the velocity of release of ATP from permeabilized cholinergic synaptic vesicles. *Neuroscience* 149:251-255

Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ (2006): Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 7:73

Gotti C, Clementi F (2004): Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74: 363-396

Grando SA, Crosby AM, Zelickson BD, Dahl MV (1993): Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: requirement of endogenous acetylcholine for outgrowth initiation. *J Invest Dermatol* 101: 804-810

Grando SA, Horton RM, Pereira EF, Diethelm-Okita BM, George PM, Albuquerque EX,

Conti-Fine BM (1995): A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 105(6): 774-781

Green WN, Millar NS (1995): Ion-channel assembly. *Trends Neurosci* 18(6): 280-287

Guirao B, Joanny JF (2007): Spontaneous creation of macroscopic flow and metachronal waves in an array of cilia. *Biophys J* 92: 1900-1917

Hansell MM, Moretti RL (1969): Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *J Morph* 128:159-17

Hahn HL, Kleinschrot D, Hansen D (1992): Nicotine increases ciliary beat frequency by a direct effect on respiratory cilia. *Clin Investig* 70: 244-251

Hayashi T, Kawakami M, Sasaki S, Katsumata T, Mori H, Yoshida H, Nakahari T (2005): ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. *Exp Physiol* 995: 535-544

Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D (2003): Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol BiochemPharmacol* 147:1–46

Hoo AF, Henschen M, Dezateux C, Costeloe K, Stocks J (1998): Respiratory function among preterm infants whose mothers smoked during pregnancy. *Am J Respir Crit Care Med* 158:700–705

Hussong J, Faulhammer P, Noreikat K, Kummer W, Sharp KV, Lindken R (2008): In vivo μ PIV Messungen an Zilien in Mäuseluftröhren. Paper: Fachtagung „Lasermethoden in der Strömungsmesstechnik“, Karlsruhe

Jeffery PK, Reid L (1975): New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J Anat* 120:295-320

Jensen AA, Frølund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P (2005): Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem* 48(15):4705-45

Jiang LH, Gamper N, Beech DJ (2011) Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. *Curr Drug Targets* 12(5):724-36

Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideria A, Zouridakis M, Tzartos SJ (2007): Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J* 274: 3799-3845

Kalra S, Singh SP, Savage SM, Finch GL, Sopori ML (2000): Effects of cigarette smoke on immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signalling in T cells and depletes IP3-sensitive Ca^{2+} stores. *J Pharmacol Exp Ther*, 293: 166-171

Kasai H, Augustine GJ (1990): Cytosolic Ca^{2+} gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature* 348: 735-738

Katzung BG (1998): Basic and clinical pharmacology. *New York, McGraw-Hill/Appleton and Lange*

Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL (2002): Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 540(Pt 2):425-34

Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I (1997): Non-neuronal acetylcholine, a signaling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355: 515-523

Klein MK, Haberberger RV, Hartmann P, Faulhammer P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, König P (2009). Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur Respir J* 33, 1113-1121

Kordik P, Bulbring E & Burn JH (1952): Ciliary movement and acetylcholine. *Br J Pharmacol Chemother* 7: 67-79

Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W (2011). Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(23): 9478–9483

Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Choi C, Lindstrom J (2000): Human $\alpha 6$ AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses. *Neuropharmacology* 39:2570–2590

Langley JN (1905): On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curare. *J Physiol* 33:374–413

Lee CH, Wu CH, Ho JS (2011). From smoking to cancers: novel targets to neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Oncol* 693424

Lindstrom J (1997). Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol* 15(2): 193-222

Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H (2005): Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 79-88

Loewi O, Navratil E (1926): Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung: X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoff. *Pflugers Arch Gesamte Physiol* 214: 678-688

Lukas RJ, Changeux JP, Le Novere N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quirk M, Taylor PW, Wonnacott S (1999): International Union of pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51: 397-401

Mabley JG, Pacher P, Southan GJ, Salzman AL, Szabo C (2002): Nicotine reduces the incidence of type I diabetes in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 876-881

Maimoona AZ, Knowels MR, Omran H (2007): Genetic Defects in Ciliary Structure and Function. *Annu Rev Physiol* 69:423-450

Marshall W.F., Nonaka, S (2006): Cilia: Tuning in to the cell's antenna. *Curr Biol* 16(15): R604–R614

Martin BR, Onaivi ES, Martin TJ (1989): What is the nature of mecamylamine's antagonism of the central effects of nicotine? *Biochem Pharmacol* 38: 3391–3397

Millar NS (2003): Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* 31: 869-874

Millar NS Gotti C (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56(1): 237-246

Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindstrom, J., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S (1984): Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature (London)* 307: 604–608

Morris D (1966). The choline acetyltransferase of human placenta. *Biochem J* 98:754–762

Nachmansohn D, Machado AL (1943): The formation of acetylcholine: a new enzyme choline acetylase. *J Neurophysiol* 6: 397-403

Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndoeye A, Jolkovsky DL, Webber RJ, Buchli R, Grando SA (2000). Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res* 79:939–949

Okuda T, Tatsuya H (2000): Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Letters* 484(2): 92-97

Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicomble JG (1980): The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res* 208:65-84

Paleari L, Catassi A, Ciarlo M, Cavalieri Z, Bruzzo C, Servent D, Cesario A, Chessa L, Cilli M, Piccardi F, Granone P, Russo P (2008): Role of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor in human non-small cell lung cancer proliferation. *Cell Prolif* 41(6):936-59

Papke R (1993): The kinetic properties of neuronal nicotinic receptors: genetic basis of functional diversity. *Prog Neurobiol* 41(4):509-31

Paterson D, Nordberg A (2000): Neuronal nicotinic receptor in the human brain. *Prog Neurobiol* 65(1):75-111

Pavelka M, Ronge HR, Stockinger G (1976): Vergleichende Untersuchung am Tracheal-epithel verschiedener Säuger. *Acta anat* 94:262-282

Pfeil U, Lips KS, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, Kummer W (2003): Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:473-77

Quik M, Chan J, Patrick J.(1994): Alpha-Bungarotoxin blocks the nicotinic receptor mediated increase in cell number in a neuroendocrine cell line. *Brain Res* 655(1-2):161-7

Reigada D, Díez-Pérez I, Gorostiza P, Verdaguer A, Gómez de Aranda I, Pineda O, Vilarrasa J, Marsal J, Blsai J, Aleu J, Solsona C (2003): Control of neurotransmitter

release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3485-3490

Reinheimer T, Bernedo P, Klapproth H, Oelert H, Zeiske B, Racke K, Wessler I (1996): Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 270:722-728

Reinheimer T, Baumgärtner D, Höhle KD, Racké K, Wessler I (1997): Acetylcholine via muscarinic receptors inhibits histamine release from human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 389-395

Rowell PR, Sastry BV (1981): Human placental cholinergic system: depression of the uptake of α -aminoisobutyric acid in isolated human placental villi by choline acetyltransferase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 216: 232-238

Sadé J, Eliezer N, Silberberg A, Nevo AC (1970): The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis* 102:48-52

Salathè M (2007): Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol* 69:401-422

Sandborn WJ (1999): Nicotine therapy for ulcerative colitis: a review of rationale, mechanisms, pharmacology, and clinical results. *Am J Gastroenterol*, 94: 1161-1171

Sanderson MJ, Dirksen ER (1985): A versatile and quantitative computer-assisted photo-electronic technique used for the analysis of ciliary beat cycles. *Cell Motil* 5:267-292

Sargent PB (1993): The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16:403-443

Sastry BV, Sadavongvivad C (1978): Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 30:65-132

Satir P (1980): Structural basis of ciliary movement. *Environ Health Perspect* 35:77-82

Satir P, Christensen ST (2008): Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol* 129:687-693

Satir P, Matsouka T (1989): Splitting the ciliary axoneme: implications for a “switch point” model of dynein arm activity in ciliary motion. *Cell Motil Cytoskeleton* 14(3):345-358

Satir P, Sleight MA (1990): The physiology of cilia and mucociliary interaction. *Annu Rev Physiol* 52:137-155

Savage SM, Donaldson LA, Cherian S, Chilukuri R, White WA, Sopori ML (1991): Effects of cigarette smoke on the immune response. II. Chronic exposure to cigarette smoke inhibits surface immunoglobulin-mediated responses in B cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 111(3):523-529

Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993): Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13(2): 596-604

Sekhon HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, Lindstrom J, Spindel ER (1999): Prenatal nicotine increases pulmonary $\alpha 7$ nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J Clin Invest* 103:637–647

Shytle RD , Penny E, Silver AA, Goldman J and PR Sanberg PR (2002): Mecamylamine (Inversine®): an old antihypertensive with new research directions. *J Hum Hypertens* 16(7): 453–457

Sleight MA, Blake JR, Liron N (1988): The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* 137:726-741

Smith DJ, Gaffney EA, Blake JR (2008): Modelling mucociliary clearance. *Respir Physiol Neurobiol* 163(1-3):178-88

Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER (2003): Acetyl-choline is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 63:214–221

Song P, Sekhon HS, Fu XW, Maier M, Jia Y, Duan J, Proskosil BJ, Gravett C, Lindstrom J, Mark GP, Saha S, Spindel ER (2008): Activated cholinergic signaling provides a target in squamous cell lung carcinoma. *Cancer Res* 68(12):4693–4700

Starke K (1996): Kapitel: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems, in: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Spektrum, Heidelberg, s.112-115*

Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JA, Damann N, Everaerts W, Benoit M, Janssens A, Vennekens R, Viana F, Nemery B, Nilius B, Voets T (2009): Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci* 12(10):1293-9

Taylor B, Wadsworth J (1987): Maternal smoking during pregnancy and lower respiratory tract illness in early life. *Arch Dis Child* 62:786–791

Tuček S (1982): The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322: 53-69

Unwin N (2003): Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555(1): 91-95

Wanner A, Salathé M, O’Riordan TG (1996): Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1868-1902.

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (1998): Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77:59-79

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (1999): The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198-205

Wessler I, Kirkpatrick CJ (2001b): The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14:423-434

Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H (2001c): Release of non-neuronal, acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* 134: 951-956

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ (2003): The nonneuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sci* 72:2055-2061

West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S, Dennis PA (2003). Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 111:81–90

Whittaker VP, Eichler O, Farah A, Koelle GB (eds) (1963): Identification of acetylcholine and related esters of biological origin, in: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 15:1-39

Wonnacott S, Barik J (2007): Nicotinic ACh Receptors. *Tocris Bioscience* No. 28

Yu CR, Role LW (1998): Functional contribution of the $\alpha 7$ subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurons. *J Physiol* 509(Pt 3):651-65

Zia S, Ndoye A, Lee TX, Webber RJ, Grando SA (2000). Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 293:973–981

8 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine intensive und hilfreiche Unterstützung.

Herzlich bedanken möchte ich mich ferner für die freundliche Betreuung durch Frau Dr. Gabriela Krasteva, die mich nicht nur auf wissenschaftlicher Basis, sondern auch freundschaftlich unterstützt hat.

Ein außerordentliches Dankeschön gilt Petra Faulhammer für die Einarbeitung und die Unterstützung bei der Durchführung der Mausversuche, die ohne sie nicht möglich wären und einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Patricia Berger möchte ich mich bedanken für die immer freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Suche der Literaturquellen.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Lebenspartner Kai, der immer ein offenes Ohr für mich hatte, für den Rückhalt und stetige, liebevolle Motivation.

Letztendlich widme ich dieser Arbeit meiner Mutter für die Liebe, finanzielle Unterstützung über die Jahre, dafür, dass sie mir immer wieder helfend zur Seite mit Rat stand.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6258-3



9 7 8 3 8 3 5 9 6 2 5 8 3